

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

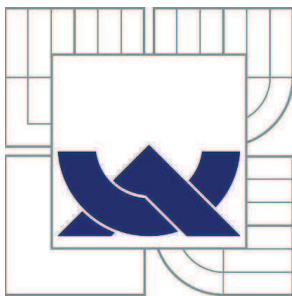
KATIONAKTIVNÍ FLUORESCENČNÍ SONDY V SYSTÉMU  
POLYANION-TENZID

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

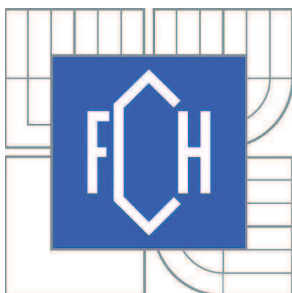
JAKUB MONDEK

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# KATIONAKTIVNÍ FLUORESCENČNÍ SONDY V SYSTÉMU POLYANION-TENZID

CATIONIC FLUORESCENCE PROBES IN A POLYANION-SURFACTANT SYSTEM.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

JAKUB MONDEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK0451/2009</b>	Akademický rok: <b>2009/2010</b>
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	<b>Jakub Mondek</b>	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	<b>prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.</b>	
Konzultanti:	Ing. Tereza Halasová	

### Název bakalářské práce:

Kationaktivní fluorescenční sondy v systému polyanion-tenzid

### Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o využití kationaktivních fluorescenčních sond v systémech polyanion-tenzid, zvláště se zaměřením na hyaluronan jako modelový biopolymer.
2. Seznámit s měřením pomocí kationaktivních fluorescenčních sond.
3. Navrhnout a provést základní experimenty k ověření využití uvedené metody ve studiu interakcí hyaluronanu s tenzidy.
4. Zhodnotit výsledky ve vztahu k formulaci nosičových systémů biologicky aktivních látek na bázi hyaluronanu.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Jakub Mondek  
Student(ka)

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

V této bakalářské práci byly studovány vlastnosti vodných roztoků hyaluronanu a cetyltrimethylamonium bromidu pomocí fluorescenční sondy akridinové oranže. Nejprve byla zkoumána interakce akridinové oranže a hyaluronanu. Bylo sledováno emisní a absorpční spektrum akridinové oranže. Bylo zjištěno, že na karboxylových skupinách hyaluronanu docházelo k tvorbě dimerů akridinové oranže. Dále byla studována interakce cetyltrimethyl amonium bromidu se systémem akridinová oranž – hyaluronan. Bylo zjištěno, že kationaktivní tenzid vytlačoval dimery akridinové oranže a sám se vázal na karboxylové skupiny hyaluronanu. Tím došlo k rozpadu dimeru akridinové oranže na monomery.

Důvodem, proč byla tato práce zaměřena na studování vlastností vodných roztoků hyaluronanu s kationaktivním tenzidem je ten, že systém hyaluronan – tenzid by mohl být přínosem pro výzkum nosičových systémů pro cílenou distribuci léčiv.

## **ABSTRACT**

In this bachelor thesis were studied properties of aqueous solutions of hyaluronan and cetyltrimethylamonium bromid with help of acridine orange as fluorescence probe. At first, this thesis was focused on interactions of acridine orange and hyaluronan. Emission and excitation spectra of acridine orange were observed. Result of these measurement was bonding of acridine orange dimer to carboxylic group of hyaluronan. Next studied interaction was interaction of cetyltrimethyl amonium bromid with acridine orange – hyaluronan system. Result of these interaction was, that molecules of cationactive surfactant pushed away dimers of acridine orange and took place of dimer of acridine orange on carboxylic group of hyaluronan. Dimer of acridine orange was changed into monomers.

The reason why this thesis was focused on study of aqueous solutions of hyaluronan with cationactive surfactant is benefit of hyaluronan – surfactant system in research of transport system for target distribution of drugs.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Kyselina hyaluronová, akridinová oranž, asociační procesy, tenzidy

## **KEY WORDS**

Hyaluronic acid, acridine orange, association processes, surfactants

Mondek, J. *Kationaktivní fluorescenční sondy v systému polyanion-tenzid*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 38 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc., konzultantce Ing. Tereze Halasové a také Ing. Filipu Mravcovi, PhD. za trpělivost, pomoc při řešení problémů a vstřícnost. Dále bych chtěl poděkovat své rodině za podporu při studiu.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
	2.1. Molekulární absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti .....	8
	2.1.1. Princip molekulární absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti .....	8
	2.1.2. Základní veličiny .....	8
	2.1.2.1. Transmittance .....	8
	2.1.2.2. Absorbance .....	8
	2.1.2.3. Lambert – Beerův zákon .....	9
	2.1.3. Absorpční křivky v UV a VIS .....	9
	2.2. Luminiscenční spektrometrie .....	10
	2.2.1. Fotoluminiscence .....	10
	2.2.1.1. Fluorescence .....	10
	2.2.1.2. Fosforescence .....	11
	2.2.2. Emisní a excitační spektra molekul.....	12
	2.2.2.1. Emisní spektrum.....	12
	2.2.2.2. Excitační spektrum.....	12
	2.2.3. Zhášení fluorescence .....	12
	2.3. Nevlastní fluorescence .....	14
	2.3.1. Fluorescenční značky .....	14
	2.3.2. Fluorescenční sondy .....	14
	2.4. Asociační procesy .....	15
	2.4.1. Asociativní (micelární) koloidy .....	15
	2.4.1.1. Molekulární struktura micelárních koloidů .....	16
	2.4.1.2. Vznik micel .....	16
	2.4.1.3. Struktura micel ve zředěném vodném roztoku.....	16
	2.4.1.4. Obrácené (reverzní) micely .....	17
	2.4.2. Solubilizace .....	17
	2.4.3. Koloidní roztoky vysokomolekulárních látek .....	18
	2.4.4. Roztoky vysokomolekulárních elektrolytů .....	19
	2.5. Kyselina hyaluronová.....	19
	2.5.1. Chemická struktura .....	20
	2.5.2. Metabolismus kyseliny hyaluronové.....	20
	2.5.3. Výskyt a vlastnosti kyseliny hyaluronové.....	20
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	21
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	22
	4.1. Použité chemikálie .....	22
	4.2. Přístroje a zařízení .....	22
	4.3. Příprava zásobních roztoků fluorescenční sondy .....	23
	4.4. Příprava zásobních roztoků hyaluronanu .....	24
	4.5. Příprava zásobních roztoků tenzidu .....	24
	4.6. Příprava vzorků .....	24
	4.6.1. Interakce fluorescenční sondy s polyelektrolytem .....	24
	4.6.2. Interakce tenzidu se systémem polyelektrolyt – fluorescenční sonda.....	24
	4.7. Vlastní měření .....	25

4.7.1.	Měření emisních spekter .....	25
4.7.2.	Měření absorpčních spekter .....	25
4.8.	Korekce emisních spekter .....	25
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	26
5.1.	Interakce fluorescenční sondy s polyelektrolytem .....	26
5.2.	Interakce fluorescenční sondy s polyelektrolytem (zúžená koncentrační řada).....	28
5.3.	Interakce tenzidu se systémem polyelektrolyt – fluorescenční sonda.....	30
6	ZÁVĚR.....	34
7	LITERATURA.....	35
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	37
8	PŘÍLOHY.....	38

# 1 ÚVOD

V dnešní době, především díky životnímu stylu lidí, se zvyšuje počet onemocnění rakovinou. Tato skutečnost je důvodem k výzkumu nových léčiv, schopných rakovinotvorné buňky ničit.

Jak víme, chemoterapeutika jsou schopná rakovinotvornou buňku zničit. Bohužel chemoterapie nezasáhne jen postižené místo, ale celé tělo. Plošným zásahem do organismu je také snížena účinnost cytostatika. Proto je důležitým faktorem při vývoji protirakovinných léčiv jejich cílenost, tedy aby skutečně působily pouze v postiženém místě. Při vývoji těchto nosičových systémů hraje důležitou roli biokompatibilita léčiva a cílenost léčiva.

Jak zajistit, že léčivo opravdu dorazí do postiženého místa? Nejlépe látkou která je v hojně míře obsažena v postiženém místě. Například v rakovinné buňce se ve zvýšené koncentraci vyskytuje kyselina hyaluronová a díky kyselině hyaluronové také rakovina metastázuje. Kyselina hyaluronová je biokompatibilní látka, která se zcela přirozeně vyskytuje v lidském těle. Mimo rakovinné buňky se vyskytuje například ve sklivci oka nebo ve vazivové tkáni (synoviální tekutina), kde zajišťuje hladký pohyb kloubů. Dále je například nezbytnou součástí extracelulární matrix. Vzhledem k biokompatibilitě a k vysokému obsahu kyseliny hyaluronové v rakovinných buňkách se předpokládá, že by se nosičový systém obalený kyselinou hyaluronovou měl dostat přímo k rakovinné buňce a po vstřebání nosiče s hyaluronanem rakovinnou buňkou by se léčivo uvolnilo a buňku zničilo. Tím by nebyla zasažena jiná část organismu, pouze postižené místo.

Samotný hyaluronan ale nedokáže dopravit léčivo na postižené místo. K tomu je zapotřebí další látka, která se bude vázat na hyaluronan a zároveň dokáže pojmout léčivo. Ideálními látkami v tomto případě jsou tenzidy. Kationaktivní tenzidy by se měly být schopné vázat na disociované karboxylové skupiny hyaluronanu a navíc tenzidy obecně tvoří agregáty schopné ve svém středu rozpustit hydrofobní látku, tedy například hydrofobní léčivo. Takovýto komplex léčiva, tenzidů v podobě micel a polyelektrolytu hyaluronanu by byl ideálním nosičem léčiv, a to nejen pro léčbu rakoviny.

Hyaluronan je často spojován s hojením ran, kdy se připisuje hyaluronanu organizace pojivové tkáně v místě srůstu. Proto se používá v některých přípravcích na hojení ran. Hyaluronan zajišťuje vlhké prostředí a rozpadá se na krátké polysacharidy nebo oligosacharidy s regulační aktivitou.

V dnešní době je ale jednou z nejrozšířenějších aplikací hyaluronanu kosmetický průmysl. Většina hyaluronanu v lidském těle se nachází v pokožce. Hyaluronan dokáže vyhlazovat vrásky a hydratuje pokožku, proto je přidáván do kosmetických přípravků proti vráskám. Problémem je, že hyaluronan se pozvolna přirozeně odbourává, takže vrásky nevyhladí úplně, ale v podstatě je pouze schová a krém je nutno nanášet stále znovu.

Dále se hledá možnost uplatnění hyaluronanu například v tkáňovém inženýrství a dále se aplikuje již například v oftalmologii, ortopedii nebo revmatologii.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Molekulární absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti

Základy molekulární absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra byly položeny již okolo roku 1670 britským vědcem sirem Isaacem Newtonem. Newton objevil, že se světlo skládá ze spektra barev, a to od fialové barvy po červenou. UV/VIS spektrofotometrie umožňuje například identifikaci měřeného vzorku nebo také určení složení absorbujících komponent.

#### 2.1.1. Princip molekulární absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti

Molekulární absorpční spektrofotometrie v UV/VIS měří absorpci záření v ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) oblasti světelného spektra zředěnými roztoky molekul, což znamená, že se při měření využívá úbytku intenzity záření, který vznikne absorpcí záření měřeným vzorkem. Při interakci molekuly se zářením dochází k energetickým změnám v elektronových orbitalech a dochází k přechodu elektronu do excitovaného stavu. Oblast molekuly, ve které jsou lokalizovány elektronové přechody v průběhu absorpce záření je chromofor. Chromoforem může být například hydratovaný kation, komplex nebo seskupení atomů v organické molekule.

#### 2.1.2. Základní veličiny

Na kyvetu obsahující roztok vzorku dopadá zářivý tok  $I_0$ . Prošlý zářivý tok  $I$  je zeslaben o odražené, rozptýlené a absorbované záření.

##### 2.1.2.1. Transmittance

Transmittance,  $T$ , je relativní část prošlého záření. Často se uvádí v procentech:

$$T = \frac{I}{I_0} \text{ nebo } T = \frac{I}{I_0} \cdot 100(\%), \quad (1)$$

kde  $I_0$  je dopadající zářivý tok a  $I$  je prošlý zářivý tok.

##### 2.1.2.2. Absorbance

Absorbance, nebo také extinkce, je záporný dekadický logaritmus transmittance:

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

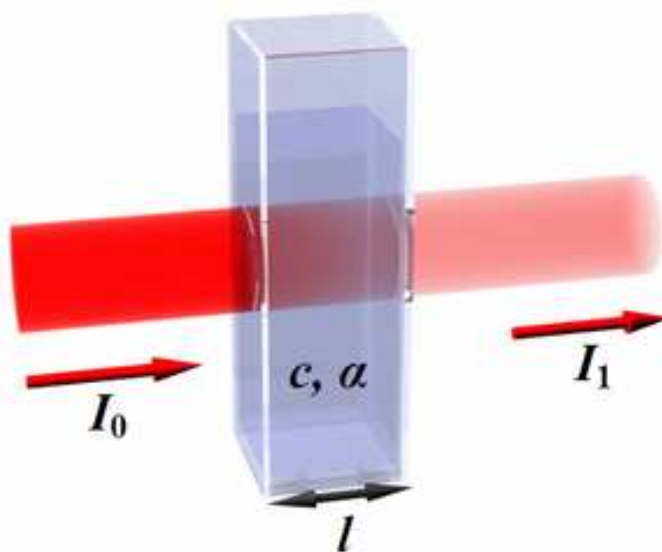
Pokud je absorpce záření nulová, transmittance je jednotková (100%).

### 2.1.2.3. Lambert – Beerův zákon

Lambert – Beerův zákon udává vztah mezi intenzitou dopadajícího a prošlého záření, délkou absorbující vrstvy a koncentrací měřeného vzorku (analytu). Absorbanci lze matematicky definovat také díky Lambert - Beerovu zákonu (Obr. 1) [1]:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c, \quad (3)$$

kde  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient (konstanta pro danou látku za daných podmínek při určité vlnové délce),  $l$  je tloušťka absorbující vrstvy (většinou tloušťka kyvety) a  $c$  je koncentrace měřeného vzorku. Absorbance je bezrozměrná veličina a je přímoúměrná koncentraci a tloušťce absorbující vrstvy.



**Obr. 1** Absorpce světelného paprsku procházejícího kyvetou, kde  $I_0$  je dopadající zářivý tok,  $I_1$  je prošlý zářivý tok,  $c$  je koncentrace měřeného vzorku,  $l$  je optická dráha (šířka kyvety) a  $\alpha$  je absorpční koeficient (charakterizuje, jak lehce materiál nebo medium propustí světelný paprsek).

Lambert - Beerův zákon platí pouze pro zředěné roztoky, pro monochromatické záření, a to v homogenních i heterogenních systémech. V heterogenních systémech (například v koloidních roztocích) dochází k odchylkám od lineárního průběhu závislosti absorbance na koncentraci vzorku vlivem difúzního rozptylu záření. Absorbance roztoku je v podstatě úměrná počtu absorbujících částic a závisí na jejich povaze.

### 2.1.3. Absorpční křivky v UV a VIS

Absorpční křivky představují závislost absorbované nebo propuštěné zářivé energie na vlnové délce, vlnótu nebo kmítočtu. Obvyklým záznamem je ale křivka závislosti absorbované zářivé energie na vlnové délce (Obr. 5). Oblasti extrémních bodů na křivce mají obvykle Gaussovský (symetrický) průběh a odpovídají typickým elektronovým přechodům v molekule.

Větší počet extrémních bodů na absorpční křivce je důkazem většího počtu elektronových přechodů v absorbující molekule, existence většího počtu struktur téže látky nebo většího počtu různých absorbujících analytů v roztoku za daných podmínek.

Na absorpční křivky mají vliv různé faktory. Například zvýšení teploty posouvá  $\lambda_{\max}$  k delším vlnovým délkám. Vysoká koncentrace inertních solí mění tvar absorpčních spekter. Dalšími faktory, které mají vliv na absorpční spektra, jsou vliv tenzidů, vliv rozpouštědla a instrumentální vlivy.

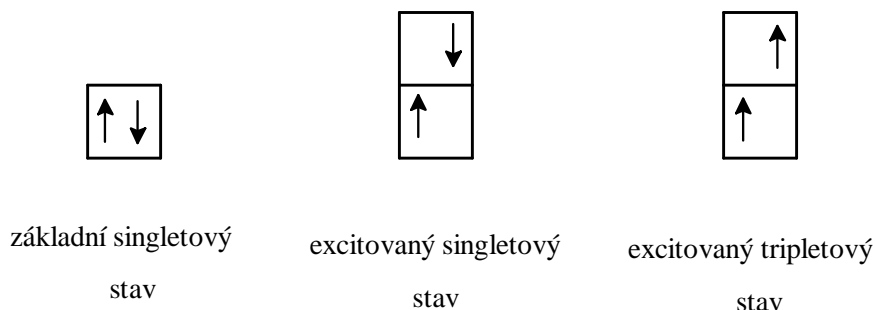
## 2.2. Luminiscenční spektrometrie

### 2.2.1. Fotoluminiscence

Po absorpci primárního záření molekulou může dojít k emisi sekundárního záření z excitovaných molekul. Tento jev se nazývá fotoluminiscence. Při absorpci záření přechází elektron ze základní singletové hladiny  $S_0$  do vzbuzeného stavu (singlet  $S_1^*$ ). Obecně se elektronové stavy dělí na singletové a tripletové (Obr. 2):

- Singletový stav: Dvojice elektronů má opačný (antiparalelní) spin.
- Tripletový stav: Dvojice elektronů má stejný (paralelní) spin.

Podle toho, z kterého z těchto dvou stavů se elektron navrácí do základního stavu, dělíme fotoluminiscenci na *fluorescenci* a *fosforescenci*.



**Obr. 2** Základní singletový, excitovaný singletový a excitovaný tripletový stav

#### 2.2.1.1. Fluorescence

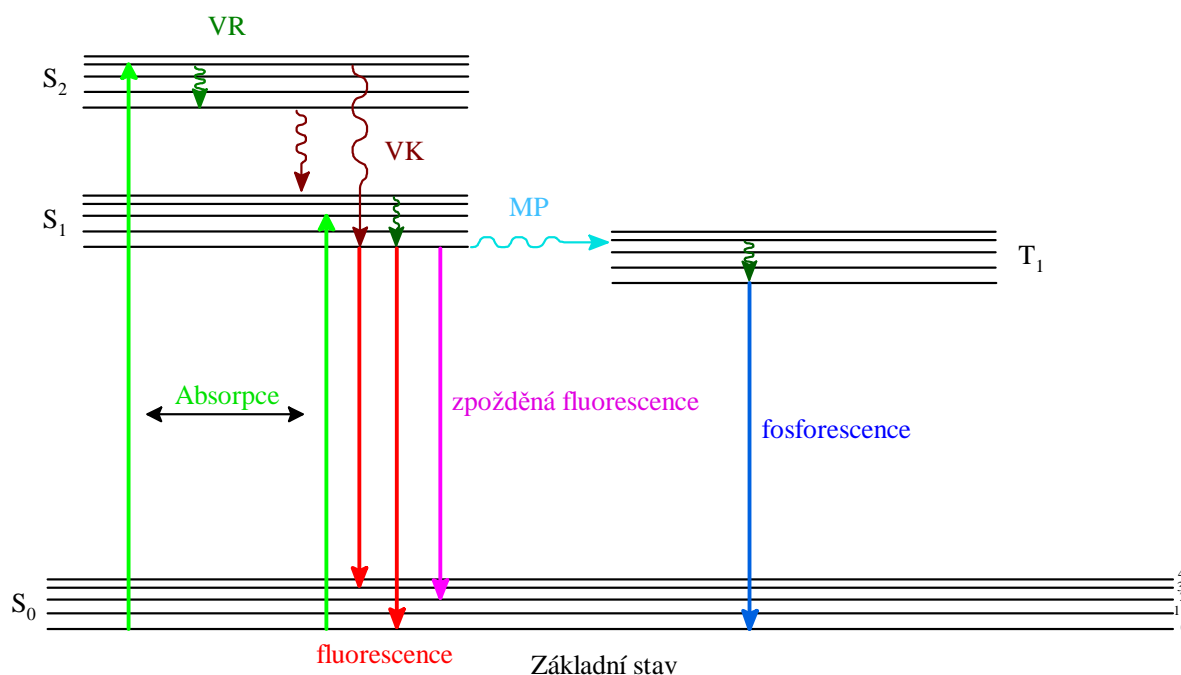
Termín fluorescence byl poprvé použit Georgem Gabrielem Stokesem v jeho práci z roku 1852. Termín fluorescence byl odvozen z názvu minerálu fluoritu, který emitoval modrou fluorescenci.

Po absorpci záření se excitovaná molekula navrácí do základního stavu za současného vyzáření fotonu. Tento přechod se nazývá *zářivý přechod*. Jedním z typů zářivého přechodu je přechod elektronu z excitovaného stavu  $S_1$  do základního stavu  $S_0$ . Tento jev se nazývá *fluorescence*. Elektron se může zářivě vrátit do základního stavu pouze z nejnižší vibrační hladiny. Pokud se excitovaný elektron nacházel v některé z vyšších vibračních hladin, přechází do nejnižší vibrační hladiny přechodem, který je nazýván *vnitřní konverze* nebo

*vibrační relaxace*. Jedná se o nezářivý přechod. Excitovaný elektron, který přešel do tripletového stavu se může přísunem energie znovu dostat do singletového stavu  $S_1$ . Ze stavu  $S_1$  se elektron vrací do základního stavu  $S_0$  za současného vyzáření fotonu a je pozorována *zpožděná fluorescence* (Obr. 3). Z toho plyne, že proces zpožděné fluorescence je analogický k mezisystémovému přechodu z  $S_1$  do  $T_1$ , pouze probíhá opačně.

### 2.2.1.2. Fosforescence

Může nastat situace, kdy proběhne nezářivý přechod ze singletového stavu  $S_1$  na hladinu  $T_1$ , kdy je přechod spojen se změnou spinového stavu. Tento děj se nazývá *mezisystémový přechod* a většinou k němu dochází, pokud se překrývají nejnižší vibrační hladiny singletového stavu s vyššími hladinami tripletového stavu. Z tripletového stavu  $T_1$  se excitovaný elektron navrácí do základního stavu  $S_0$  za současné ztráty energie ve formě fotonu. Tento děj se nazývá *fosforescence* (Obr. 3). Tripletový stav molekuly má nižší energii než příslušný singletový excitovaný stav, takže přechod do základního stavu je spojen s emisí záření o delší vlnové délce, než při fluorescenci. Protože molekula setrvává v tripletovém stavu poměrně dlouho, může ztratit svou energii snáze jinými pochody než fosforescencí, např. kolizí s molekulami rozpouštědla.



**Obr. 3** Jabloňskiho diagram – energetické přechody při vzniku fluorescence a fosforescence. Přechody: VR – vibrační relaxace, VK – vnitřní konverze, MP – mezisystémový přechod

Luminiscenční zářivý tok roste s množstvím absorbovaného záření, kvantovým výtěžkem luminiscence (tj. poměrem udávajícím počet emitovaných fotonů a absorbovaných fotonů). Luminiscenci nepříznivě ovlivňuje vyšší teplota, která zvyšuje pravděpodobnost nezářivých přechodů [5].

Fluorescence i fosforescence trvá i po přerušení budícího záření. Rozdíl je v tom, že fluorescence, která se vyskytuje hlavně v parách, kapalinách a roztocích, trvá  $10^{-8}$  až  $10^{-5}$  s po ukončení osvětlování, kdežto fosforescence trvá  $10^{-2}$  až několik hodin, popřípadě i dní [8].

### 2.2.2. Emisní a excitační spektra molekul

Emisní a excitační spektra jsou zaznamenávána pomocí spektrofluorimetru. Je-li měřena závislost intenzity fluorescence (luminiscence) v určitém rozsahu vlnových délek při konstantní excitační vlnové délce, je tato závislost nazývána *emisním* spektrem. Je-li měřena závislost intenzity fluorescence pro různé excitační vlnové délky při konstantní emisní vlnové délce, je toto spektrum nazýváno *excitační*.

#### 2.2.2.1. Emisní spektrum

Emisní spektrum je v různém výtěžku excitováno kteroukoliv vlnovou délkou v oblasti excitačního spektra a je ovlivněno různou citlivostí detektoru v závislosti na vlnové délce.

Existují 3 druhy emisních spekter [5]:

1) Atomová neboli čárová spektra:

Jsou emitována volnými atomy v plynném stavu. Kovy emitují čáry ve viditelné spektrální oblasti (vlivem nízkého ionizačního potenciálu) a nekovy emitují čáry v ultrafialové oblasti pod 200 nm (vlivem vysokého ionizačního potenciálu).

2) Molekulová neboli pásová spektra:

Sestávají z mnoha blízko sebe umístěných čar, které splývají v pásy

3) Kontinuální spektra:

Vyzařují je pevné, kapalné i plynné látky. Vyzařování je rozděleno nepřetržitě na celý rozsah vlnových délek a toto rozdělení závisí na teplotě.

#### 2.2.2.2. Excitační spektrum

Excitační spektrum je v podstatě zjednodušené absorpční spektrum analytu, protože jen některá absorpční maxima vyvolávají fluorescenci. Intenzita excitačního maxima je totožná s intenzitou absorpčního maxima při konstantní intenzitě emise zdroje v daném rozsahu vlnových délek [3].

### 2.2.3. Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence představuje jakýkoli proces snížení intenzity fluorescence vzorku. Zhášení vycházející z kolizních střetů mezi molekulami fluoroforu (látka schopná fluorescence) a zhášeče se nazývá *dynamické* zhášení. Jestliže se molekuly fluoroforu vážají na molekuly zhášeče, nazývá se toto zhášení *statické*. Zhášení všeobecně bylo a je intenzivně studováno v souvislosti s biochemickými systémy, především kvůli molekulárním interakcím v biologickém systému, které mají za následek zhášení, což vede například ke zjištění vaznosti mezi molekulami.

V případě dynamického zhášení musí zhášeč difundovat ke fluoroforu během doby, ve které se molekula fluoroforu vyskytuje v excitovaném stavu. Při kontaktu se fluorofor vrací do základního stavu, ale bez emise fotonu. Při statickém zhášení se vytvoří komplex mezi

fluoroforem a zhášecem, který nefluoreskuje. U statického i dynamického zhášení musí být fluorofor a zhášec v kontaktu [10].

Existují tyto typy zhášení fluorescence [3]:

1) Koncentrační (samo)zhášení fluorescence (Vavilov):

Od určité mezní koncentrace  $c_0$  (prahová koncentrace analytu) dochází k poklesu kvantového výtěžku fluorescence (podíl počtu emitovaných fotonů a absorbovaných fotonů). Důsledkem jsou neelastické srážky excitovaných molekul s molekulami analytu v základním stavu (možná také asociace molekul). Molekuly analytu absorbují záření, ale neemitují. Energie je vyzářena formou tepelné energie.

2) Vnitřní konverze molekul:

V důsledku kolizí excitovaných molekul s neexcitovanými dochází ke ztrátě energie excitované molekuly na nezářivé formy energie. Ztráty se zvyšují s rostoucí teplotou, dále ztráty závisí na koncentraci molekul, na viskozitě roztoku apod.

3) Vnitřní filtrační efekt prvního druhu:

Detektor spektrofluorimetru detekuje emisi záření pouze z centrální části kyvety (z jejího středu). Než dopadající záření dosáhne středu kyvety, značná část dopadajícího záření je absorbována před dosažením centrální části kyvety. Tento efekt má za následek snížení intenzity fluorescence.

4) Vnitřní filtrační efekt druhého druhu

Obsahuje-li roztok další chromofor, který absorbuje světlo při blízké vlnové délce jako fluoreskující produkt analytu, tak se chromofor chová jako filtr, který k produktu analytu propustí jen část dopadajícího záření.

5) Strukturní a konfigurační změny molekul (organických):

Převod molekuly do tripletového stavu (tvorba volného biradikálu s nepárovými elektrony, který je velmi reaktivní). Přechod na složitější sloučeniny (diméry). Vzniklé sloučeniny nemusí fluoreskovat. Při strukturní a konfigurační změně může excitovaná molekula přejít do základního stavu bez vyzáření nového záření. K tomu jsou náchylné látky s volnější strukturou, volně otáčivé části molekul. Dochází k degradaci elektronové energie na vibrační energie.

6) Vliv cizích iontů:

Pokles kvantového výtěžku fluorescence v přítomnosti cizích iontů a látek. Stupeň zhášení roste s polarizovatelností respektive s deformabilitou, s rostoucí kovalentní charakteristikou.

Zhášení anionty:  $F^- < NO_3^- < SO_4^{2-} < ac < (COO)^{2-} < Cl^- < Br^- < SCN^- < I^-$

Zhášení kationty:  $Cu^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}$  (kationty s neobsazenými d-orbitaly;  $Mn^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+} < UO_2^{2+} < Co, Ni < Fe^{3+} < Cu < Cr^{3+}$ )

Důsledkem je pohlcení elektronu ze vzbuzené hladiny fluoreskujícího chelátu analytu v neobsazeném d-orbitalu, což má za následek znemožnění návratu excitovaného elektronu do základní hladiny.

## 2.3. Nevlastní fluorescence

K látkám, které sami nemají schopnost fluoreskovat se přidávají nevlastní fluorofory. Díky nevlastním fluoroforům vzniká nevlastní fluorescence. Pokud se na studovaný vzorek váží kovalentně, nazývají se *fluorescenční značky*. Pokud se váží nekovalentně, jedná se o *fluorescenční sondy* [11].

### 2.3.1. Fluorescenční značky

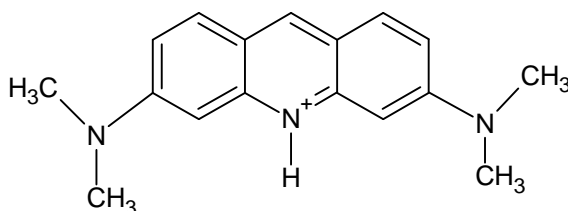
Fluorescenční značky jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám (proteinům, peptidům a jiným) váží kovalentní vazbou. nejčastěji se používají k fluorescenčnímu značení proteinů, kdy se kovalentně váží na jejich aminové nebo histidinové boční řetězce, thiolové skupiny, atd. Mají různé využití například v imunologii nebo v histochemii [11].

### 2.3.2. Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře váží nekovalentně a často přitom mění své fotofyzikální vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je nejdůležitější součástí ve fluorescenční spektroskopii, protože právě její vlastností umožňují získat potřebné informace. V současné době existuje nepřeberné množství fluorescenčních sond [11].

### Akridinová oranž

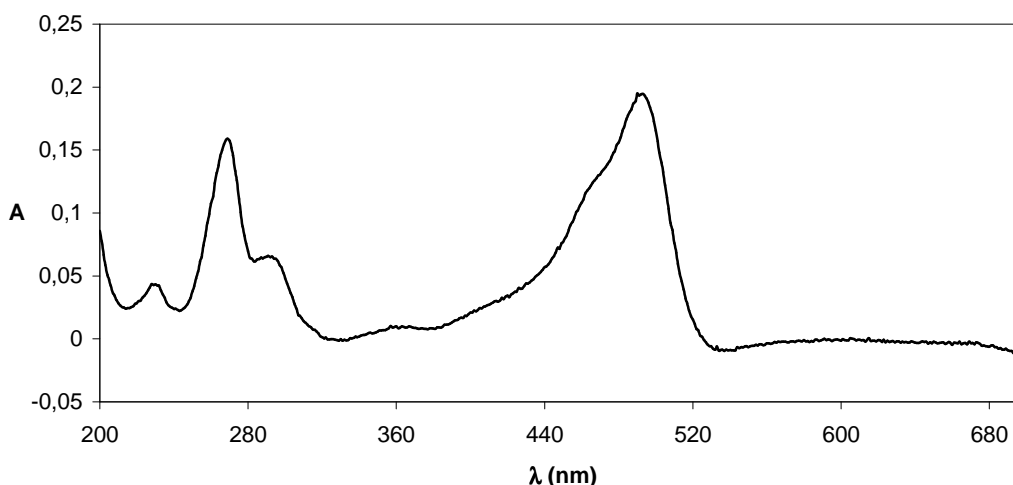
Akridinová oranž, neboli 3,6-bis(dimethylamino)akridin (Obr. 4) je kationaktivní fluorescenční sonda snadno rozpustná ve vodě. Je schopná reagovat s biologickým materiálem jako například DNA a RNA. Zejména schopnost reagovat s DNA a RNA je důvodem zájmu o tuto sondu [14]. Samotná DNA ani RNA nefluoreskují. Pokud je ke šroubovicím přidána akridinová oranž, tak se tato sonda na šroubovice elektrostaticky naváže a dochází u AO ke změnám v absorpční a fluorescenční části spektra. Pokud se AO naváže na DNA, emituje zelenou fluorescenci při 530 nm. Pokud se AO naváže na RNA, emituje červenou fluorescenci při 640 nm [23].



**Obr. 4** Akridinová oranž

Ve zředěných roztocích existuje AO pouze jako monomer. Pokud je ale koncentrace AO vyšší než  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  [16], dochází k agregaci monomeru na dimer. Tvorba dimeru zhasí fluorescenci monomeru, ale i dimer je schopný fluoreskovat, ikdyž jeho intenzita bude o mnoho nižší než intenzita samotného monomeru. Důkazem tvorby dimeru jsou absorpční

spektra akridinové oranže (Obr. 5). Monomer má absorpční maximum při 490 nm a dimer má absorpční maximum při 465 nm. S rostoucí koncentrací dimeru klesá absorpční maximum monomeru a absorpční maximum dimeru se zvyšuje. Dalším důkazem agregace monomeru na dimer jsou fluorescenční spektra AO. S rostoucí koncentrací sondy roste intenzita fluorescence až do chvíle agregace monomeru. Jakmile se dimer začne tvořit, intenzita fluorescence prudce klesá.



**Obr. 5** Absorpční spektrum akridinové oranže

Akridinová oranž se využívá pro zkoumání interakcí polymer – sonda a sonda – sonda v biopolymerech a v syntetických polyelektrolytech. Vazba sondy na polyelektrolyt může poskytnout mnoho informací o chemické a fyzikální podstatě vazných míst polymeru a o uspořádání řetězce polymeru [17].

## 2.4. Asociační procesy

### 2.4.1. Asociativní (micelární) koloidy

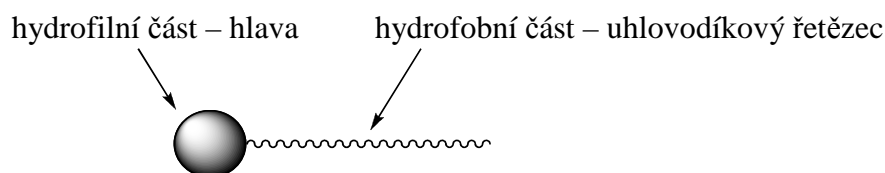
Existuje skupina látek, která jen za nízkých koncentrací tvoří pravé roztoky, ale po překročení určité koncentrace jejich molekuly asociují a vytvářejí koloidní částice. Tyto polymolekulární útvary se nazývají micely a látky, které se chovají tímto způsobem, jsou označovány jako micelární neboli asociativní koloidy [12].

Tyto soustavy bývají klasifikovány jako lyofilní, protože jsou v daném disperzním prostředí rozpustné a nepotřebují umělou stabilizaci. Velikost i fyzikální vlastnosti micel jsou určeny okamžitými stavovými veličinami (tedy teplotou, tlakem, koncentrací vlastní i koncentrací přidaných látek) a nezávisí na historii systému. Lyofilní systémy jsou reverzibilní.



### 2.4.1.1. Molekulární struktura micelárních koloidů

Schopnost vytvářet micely je podmíněna zvláštní strukturou molekul, tzv. tenzidů. Molekula tenzidu je amfipatická neboli amfifilní, tj. musí se skládat z lyofilní části, která má tendenci se v daném prostředí rozpouštět, a z lyofobní části, která je naopak v témže prostředí nerozpustná (Obr. 6). Neochota lyofobní části ke kontaktu s molekulami rozpouštědla je pak příčinou asociace. Ve většině případů se jedná o povrchově aktivní látky (PAL) rozpustné ve vodě, jejichž molekuly obsahují silně hydrofilní polární skupinu, která je schopna zajistit rozpustnost ve vodě, a silně hydrofobní nepolární část, tedy jeden nebo více uhlovodíkových řetězců. Aby docházelo k asociaci těchto látek, musí mít povrchově aktivní látky dostatečně dlouhý uhlovodíkový řetězec. Podle toho, zda a jak podléhá hydrofilní skupina elektrolytické disociaci, se dělí micelární koloidy na ionogenní a na neionogenní neboli neutrální. Ionogenní se ještě dále dělí na kationaktivní, anionaktivní a amfoterní.



**Obr. 6** Amfifilní molekula (tenzid)

### 2.4.1.2. Vznik micel

Zředěné roztoky micelárních koloidů se vyznačují charakteristickým průběhem závislosti různých fyzikálních vlastností na koncentraci. Ve velkých zředěních tvoří micelární koloidy pravé roztoky. Při určité koncentraci nastávají na křivkách koncentračních závislostí různých fyzikálně-chemických vlastností ostré zlomy. Při této určité koncentraci dosahuje hydrofobní část molekuly tenzidu minimálního styku s vodou. Tato koncentrace se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC). Je to nejvyšší možná koncentrace, při níž je asociativní povrchově aktivní látka v roztoku převážně v molekulové (iontové) formě. Často tato koncentrace kolísá v rozmezí  $10^{-5}$  až  $10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> [13]. Nad CMC dochází k tvorbě asociátů molekul rozpuštěné látky ve větší celky, koloidní micely. Tvorbu micely také charakterizuje tzv. agregační nebo asociační číslo. Toto číslo udává, kolik molekul tenzidu se podílí na struktuře micely.

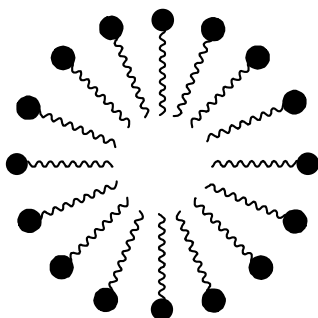
Při vyšších koncentracích se na křivkách koncentračních závislostí různých fyzikálně-chemických vlastností objevuje další zlom. Předpokládá se, že příčina tohoto jevu, který nastává při tzv. druhé CMC [13], jsou změny v typu agregace [13].

Při mnohem nižších koncentracích než je kritická micelární koncentrace, dochází k tvorbě tenzidu v micelární formě, nikoliv však k tvorbě micel. Koncentrace při které se tvoří takovéto typy agregátů, je nazývána kritická agregační koncentrace (CAC) [30].

### 2.4.1.3. Struktura micel ve zředěném vodném roztoku

Existence micel byla potvrzena mnoha experimentálními metodami, ale o jejich velikosti a tvaru, zvláště v koncentrovanějších roztocích, existuje mnoho různých představ. Velikost a tvar micel závisí na koncentraci, teplotě, struktuře PAL, charakteru mezimolekulárních sil, atd. Měřením rozptylu světla byla potvrzena domněnka, že micely ve zředěných roztocích

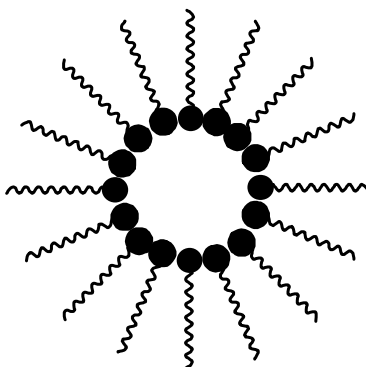
mají kulový tvar, proto se mluví o sférických micelách (Obr. 7). Na povrchu jsou molekulám vody vystaveny hydrofilní skupiny, zatímco hydrofobní uhlovodíkové řetězce jsou sdruženy v jádru micely tak, aby jejich kontakt s vodou byl co nejmenší [13].



**Obr. 7** *Struktura micely*

#### 2.4.1.4. Obrácené (reverzní) micely

Některé amfifilní molekuly vytvářejí v nepolárních rozpouštědlech micely, jejichž jádro tvoří polární skupiny, zatímco uhlovodíkové řetězce směřují ven do nepolárního prostředí (Obr. 8). Kritická micelární koncentrace u obrácených micel je těžko definovatelná, protože oblast přechodu z pravého roztoku na koloidní roztok pokrývá širší interval koncentrací. Silně polární jádro micely velmi ochotně rozpouští vodu, což má za následek zvýšení hodnoty asociačního čísla (ale i přes zvýšení asociačního čísla reverzních micel bude toto číslo stále menší, než asociační číslo micel vytvořených v polárním rozpouštědle). Kvůli polárnímu jádru bývá velmi obtížné připravit dokonale bezvodé roztoky. Jádro reverzní micely je vhodným prostředím pro katalýzu některých chemických reakcí.

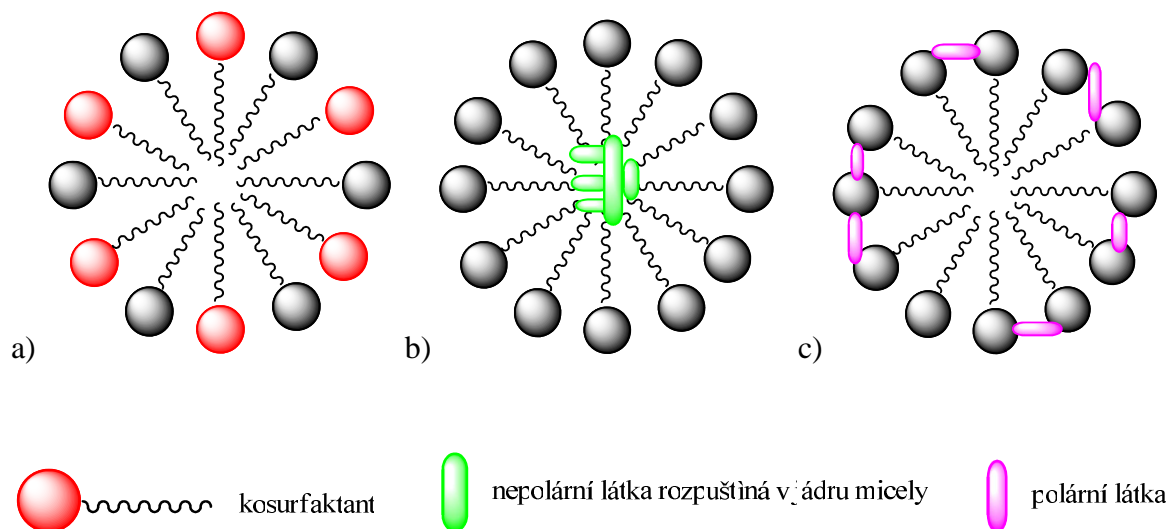


**Obr. 8** *Struktura obrácené (reverzní) micely*

#### 2.4.2. Solubilizace

Mnohé hydrofobní nebo amfifilní sloučeniny, které se ve vodných roztocích málo rozpouští nebo sloučeniny které se ve vodných roztocích nerozpouští vůbec, se rozpouští lépe v micelárně-koloidním roztoku. Tento jev je nazýván solubilizace. Lze jej pozorovat pouze při koncentraci vyšší než CMC, z toho vyplývá, že solubilizovaná látka není v koloidním roztoku přítomna v disperzním prostředí, ale je začleněna do micely.

Nepolární látky se rozpouštějí v jádru micely, amfifilní molekuly (tzv. kosurfaktanty) se rozmisťují v micelách tak, že jejich uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř micel a polární skupiny do vodné fáze. Polární látky jsou solubilizovány na povrchu micely nebo v těsné blízkosti jejího povrchu (Obr. 9) [13].



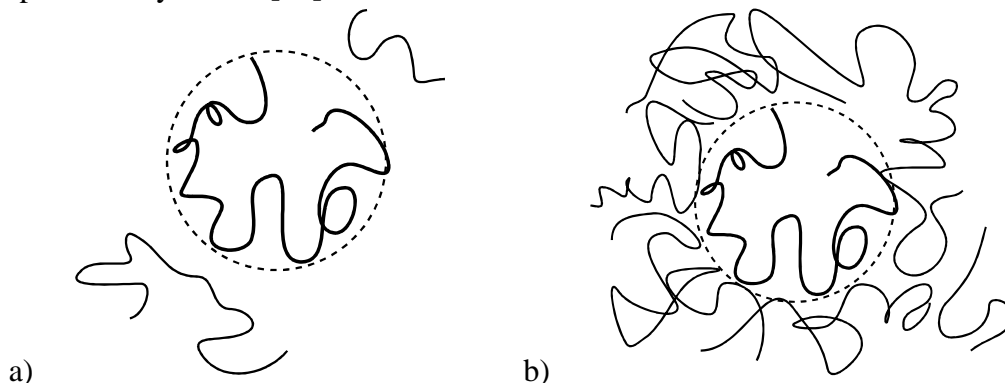
**Obr. 9** Solubilizace a) kosurfaktantů, b) nepolárních látek, c) polárních látek solubilizovaných na povrchu micely

### 2.4.3. Koloidní roztoky vysokomolekulárních látek

Roztoky vysokomolekulárních látek jsou pravé roztoky. Jejich částice se neskládají jako micely z množství malých molekul, ale jsou to jednotlivé molekuly velkých rozměrů, tedy útvary vázané chemickými valenčními silami.

Zředěný roztok vysokomolekulární látky je takový roztok, v němž jsou jednotlivá makromolekulární klubka od sebe oddělena spojitou fází rozpouštědla (Obr. 10a). Klubka se střídají s oblastmi nulové koncentrace polymeru, což znamená, že zředěný roztok je koncentračně nestejnorodý.

Je-li koncentrace vysokomolekulární látky zvyšována do té míry, kdy domény klubek vyplní celý prostor roztoku a začínají se navzájem překrývat (Obr. 10b), přestává platit definice pro zředěný roztok [12].



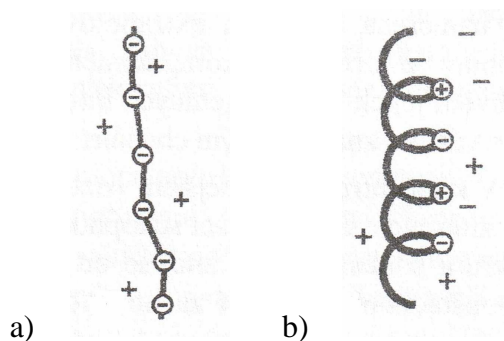
**Obr. 10** Roztoky vysokomolekulárních látek a) zředěný roztok, b) koncentrovaný roztok

#### 2.4.4. Roztoky vysokomolekulárních elektrolytů

Molekuly řady vysokomolekulárních látek obsahují ionogenní skupiny a jsou schopné v roztoku vytvářet ionty, tedy disociovat. Tyto vysokomolekulární elektrolyty jsou nazývány polyelektrolyty. Právě takovým příkladem polyelektrolytu, patřícího do skupiny polyelektrolytů obsahujících kyselé skupiny, je kyselina hyaluronová, která obsahuje karboxylové skupiny.

Chování makromolekul, které v roztoku elektrolyticky disociují, je ovlivněno kromě mezimolekulárních disperzních sil i silami elektrostatickými. Pokud neobsahuje roztok žádný jiný elektrolyt kromě vysokomolekulárního, vliv elektrostatických sil je velký, ale podstatně se zeslabuje přidávkem i malého množství nízkomolekulárního elektrolytu.

Lineární makromolekula obsahující pouze náboje stejného znaménka se jen málo svinuje v klubko a ve zředěných roztocích existuje spíše ve formě nataženého řetězce (Obr. 11a). To je způsobeno velkými odpudivými silami mezi souhlasně nabitými skupinami. Tvar makromolekuly je ale ovlivněn i malými opačně nabitými ionty přítomnými v roztoku. Tyto ionty vytvářejí kolem makromolekuly iontovou atmosféru opačného náboje, která zeslabuje odpudivé účinky elektrostatických sil. Iontovou atmosférou je myšleno takové rozložení iontů, kdy v blízkém okolí centrálního iontu převládá četnost iontů s opačným znaménkem (protiiontů) nad četností iontů souhlasně nabitých (koiontů). Přidávkem nízkomolekulárního elektrolytu stoupá iontová síla roztoku, iontová atmosféra se kolem nabitých skupin stlačuje a makromolekula se svíjí v klubko. Ke svinutí původně nataženého řetězce stačí již malé množství elektrolytu. Podobný vliv jako malý přídavek nízkomolekulárního elektrolytu má i zvýšení koncentrace polyelektrolytu. U amfoterních makromolekul, u kterých se pravidelně střídají kladné a záporné náboje, se řetězec svinuje do cívkovitého nebo spirálovitého tvaru (Obr. 11b) [13].



**Obr. 11** *Struktura vysokomolekulárních elektrolytů a) makromolekula se souhlasnými náboji ve zředěném roztoku bez nízkomolekulárního elektrolytu, b) amfoterní makromolekula s pravidelně se střídajícími kladnými a zápornými náboji*

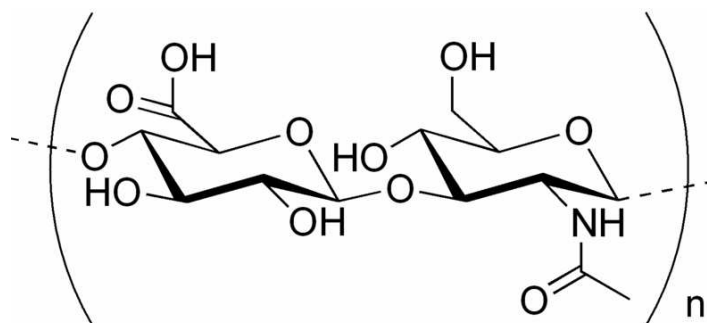
#### 2.5. Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je vysokomolekulární, biologicky odbouratelný, netoxický a nehořlavý lineární polysacharid, který objevili v roce 1934 Karl Meyer a jeho asistent John Palmer. Izolovali ji ze sklivce hovězích očí. Název kyselina hyaluronová vznikl ze slov hyaloid (sklivce) a uronová kyselina. Nejčastěji je tato látka označována jako *hyaluronan* [21].

Kyselina hyaluronová nabízí mnoho klinických uplatnění. První klinické použití kyseliny hyaluronové se datuje do roku 1968, kdy byly popáleniny léčeny čištěnou kyselinou hyaluronovou. Od té doby si kyselina hyaluronová našla cestu do téměř všech oblastí medicíny [19].

### 2.5.1. Chemická struktura

Z hlediska chemické struktury se hyaluronan skládá ze stále se opakujících sacharidových jednotek, a to z kyseliny D-glukoronové a z D-N-acetylglukosaminu. Jednotlivé sacharidové jednotky se k sobě váží beta-1,4 a beta-1,3 glykosidickými vazbami (Obr. 12).



**Obr. 12** Chemická struktura kyseliny hyaluronové

### 2.5.2. Metabolismus kyseliny hyaluronové

Metabolismus hyaluronanu je velmi dynamický. Některé buňky, jako například chondrocyty v chrupavkách, aktivně syntetizují a katabolizují hyaluronan po celý jejich život. Studie těchto metabolismů ukázaly, že poločas rozpadu hyaluronanu v chrupavkách se pohybuje okolo dvou až tří týdnů. Dalším příkladem buněk, které aktivně syntetizují a rozkládají hyaluronan, patří keratinocyty v pokožce. V tomto případě je poločas rozpadu hyaluronanu podstatně nižší. Je menší než den [21].

### 2.5.3. Výskyt a vlastnosti kyseliny hyaluronové

Hyaluronan se vyskytuje u všech obratlovců nebo u streptokoků. U člověka se ve vysoké koncentraci vyskytuje v kožní tkáni, v kloubech nebo v očním sklivci. Má unikátní hygroskopické, reologické a viskoelastické vlastnosti.

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Fluorescenční sonda akridinová oranž je v současné době mnoho využívána na výzkum biologických molekul, jako jsou proteiny [16], [25] nebo nukleové kyseliny [23], [26], [27], [28]. Zejména se využívá schopnosti dimeru AO zhaset fluorescenci. Fluorescenční vlastnosti sondy hrají důležitou roli v porozumění mechanismu tvorby mnoha molekulových komplexů se sondou a nebo jsou díky sondě molekulové komplexy detekovány v přírodě nebo organismu.

K detekci proteinů může sloužit komplex anionaktivního tenzidu s akridinovou oranží. Anionaktivní tenzid podporuje tvorbu dimeru AO. Pokud je do systému anionaktivního tenzidu s AO přidán protein, tak protein s anionaktivním tenzidem reagují za vzniku komplexu a zároveň jsou některé dimery AO přeměněny na monomery. Detekce proteinu je zajištěna právě rozpadem dimerů na monomery. Jelikož je intenzita fluorescence dimeru mnohem nižší než intenzita fluorescence monomeru, je tento rozpad, tedy i detekce proteinu, následován zvýšením intenzity fluorescence [16].

Aplikace akridinové oranže se také uplatňuje při detekci některých hormonálních reakcí v organismu. Ke zjištění, jestli proteinkinasa C hraje roli v interakcích inzulinu a růstového hormonu, byl testován efekt akridinové oranže na lipogenní aktivitu obou hormonů. Akridinová oranž je silným inhibitorem kinasy C. AO zcela zastavila účinek inzulinu a růstového hormonu, zatímco 9-akridin karboxylová kyselina, analog akridinové oranže neinhibující kinasu C, neměl na inhibici žádný vliv. Z toho plyne, že se akridinová oranž přímé hormonální vazby neúčastnila a že kinasa C ovlivňuje reakce inzulinu a růstového hormonu [25].

Akridinové oranže se dále využívá například v životním prostředí. S intenzivní aplikací syntetických detergentů se stalo monitorování především anionaktivních tenzidů ve vodě důležitým tématem. Akridinová oranž je schopná velice kvalitně detekovat zejména anionaktivní tenzidy. Další látkou schopnou detekovat anionaktivní tenzidy s podobnou přesností jako akridinová oranž je methylenová modř. Její nevýhodou je ale potřeba organického činidla pro extrakci methylenové modři [24].

Ve výzkumu nukleových kyselin je akridinová oranž téměř nepostradatelná. Je to z důvodu, že akridinová oranž dokáže od sebe spolehlivě odlišit dvouřetězcovou a jednořetězcovou nukleovou kyselinu, a to emisí zelené, respektive červené fluorescence. Toho se využívá například při rozlišení fyziologického stavu mikroorganismů. Například rychle rostoucí organismus má vysoký obsah RNA, zato neaktivní bakterie obsahuje většinou převážně DNA. Proto bude akridinová oranž vázaná na rostoucí buňku emitovat především při 640 nm a akridinová oranž vázaná na neaktivní buňku především při 530 nm. Využívá se toho například při stanovení rezistivity antibiotika vůči bakteriím [29].

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Použité chemikálie

<i>Kyselina hyaluronová</i>	CPN spol. s. r. o. (kyselina hyaluronová kosmetická, $M_w = 1,36$ MDa) Číslo šarže: 050907 – 7
<i>Fluorescenční barviva</i>	Acridine orange hydrochloride hydrate: Sigma-Aldrich Chemie GmBh, pro vědu a výzkum Číslo šarže: 02220TE
<i>Povrchově aktivní látky</i>	Cetyltrimethyl amonium bromid: Sigma-Aldrich Chemie GmBh, pro molekulární biologii Číslo šarže: 1406508

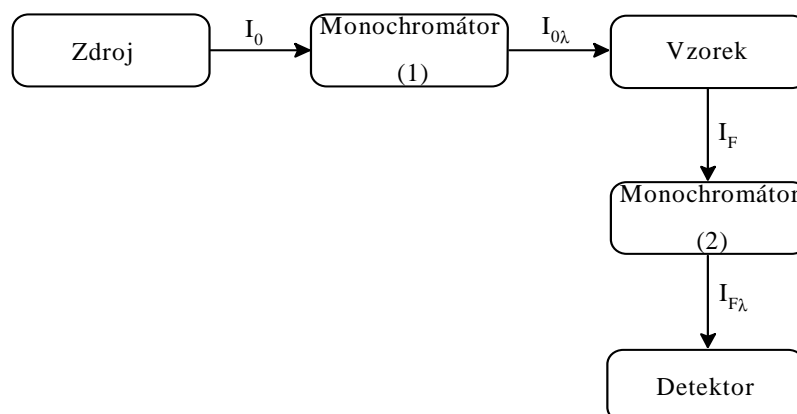
### 4.2. Přístroje a zařízení

<i>Analytické váhy</i>	Denver instrument BC-BC-100
<i>Mikropipety</i>	Finnpipette, Biohit, Vitrum
<i>Magnetické míchadlo</i>	Heidolph MR Hei-Standard
<i>Vibrační míchadlo</i>	MS2 Minishaker

#### *Luminiscenční spektrometr, AMINCO-Browman, Series 2*

Zdroj záření	Xenonová lampy 150 W, Záblesková lampa 7 W
Monochromátory	Mřížka konkávní holografická, iontově lepená
Rozmezí $\lambda$	220 - 850 nm
Přesnost $\lambda$	$\pm 0,5$ nm
Opakovatelnost $\lambda$	$\pm 0,25$ nm
Rychlost skenu	3 - 6000 nm/min

Z primárního zdroje polychromatického záření vstupuje záření do mřížkového monochromátoru 1 (excitační), kde se vybere záření o vhodné vlnové délce excitace. Selektivní paprsek o přesně definované vlnové délce prochází křemennou kyvetou se vzorkem, která je umístěna v jeho optické dráze. Dochází k excitaci elektronů zkoumaného vzorku. Fluorescence je pozorována v kolmém směru ke směru paprsku primárního záření, aby primární záření procházející kyvetou nerušilo měření fluorescence. Proto jsou druhý monochromátor (emisní) i detektor umístěny v kolmém směru ke kyvetě. Emisní záření prochází monochromátorem 2, kde je stanovena jeho vlnová délka a pomocí detektoru je zjištěna intenzita fluorescence (Obr. 13) [5].

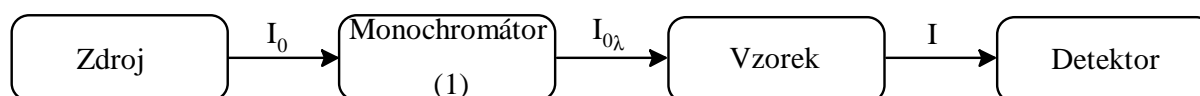


**Obr. 13** Schéma jednopaprskového spektrofluorimetru Aminco Bowman, který se skládá ze zdroje záření, excitačního monochromátoru, kyvetového prostoru pro vzorek, emisního monochromátoru a detektoru.

#### UV-VIS Spektrofotometr, Cary 50 Probe

Zdroj záření	Xenonová pulzní lampa
Monochromátor	Czerny-Turner 0,25 m
Rozmezí $\lambda$	190 – 1100 nm
Opakovatelnost $\lambda$	$\pm 0,1$ nm
Max rychlost skenu	24 000 nm/min
Detektor	2 křemíkové diody

UV-VIS spektrofotometr je zařízení, které měří absorpci záření v UV a VIS oblasti světelného spektra. Záznamem těchto měření jsou absorpční spektra měřeného vzorku. Zařízení se skládá ze zdroje záření, monochromátoru (zde se získá monochromatické záření, tedy záření o určité vlnové délce), kyvety se vzorkem a detektoru. V detektoru je zaznamenán úbytek intenzity monochromatického záření procházejícího vzorkem.



**Obr. 14** Schéma UV-VIS spektrofotometru

### 4.3. Příprava zásobních roztoků fluorescenční sondy

Na analytických vahách bylo naváženo 6,5 mg barviva AO. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 25 ml odměrné baňky. Po rozpuštění navážky byl roztok doplněn mili-Q vodou po rysku. Byl tak připraven odměrný roztok AO o koncentraci  $9,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .



#### 4.4. Příprava zásobních roztoků hyaluronanu

Na analytických vahách bylo naváženo 30,4 mg hyaluronanu. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky. Po rozpuštění navážky byl roztok doplněn mili-Q vodou po rysku. Byl tak připraven zásobní roztok hyaluronanu o koncentraci  $0,304 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Na analytických vahách bylo naváženo 31,1 mg hyaluronanu o molární hmotnosti 1,36 MDa. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky. Po rozpuštění navážky byl roztok doplněn mili-Q vodou po rysku. Byl tak připraven zásobní roztok hyaluronanu o koncentraci  $0,311 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

#### 4.5. Příprava zásobních roztoků tenzidu

Na analytických vahách bylo naváženo 2,7344 g tenzidu cetyltrimethyl amonium bromidu. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 250 ml odměrné baňky. Po rozpuštění navážky byl roztok doplněn mili-Q vodou po rysku. Byl tak připraven zásobní roztok CTAB o koncentraci  $3 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

#### 4.6. Příprava vzorků

##### 4.6.1. Interakce fluorescenční sondy s polyelektrolytem

Do plastových zkušev bylo napipetováno 15,3  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku fluorescenční sondy akridinové oranže. Výsledná koncentrace AO ve zkuševkách byla  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Do každé zkuševky bylo k fluorescenční sondě přidáváno ze zásobního roztoku různé množství kyseliny hyaluronové tak, aby po následném doplnění zkuševky mili-Q vodou na výsledný objem 3 ml byla vytvořena koncentrační řada o 20 vzorcích v koncentračním rozsahu kyseliny hyaluronové  $0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  až  $3 \cdot 10^{-1} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Vzorky pro zúženou koncentrační řadu byly připraveny stejným způsobem jako v předchozím případě. Změna byla pouze v koncentrační řadě, která činila 16 vzorků v koncentračním rozsahu kyseliny hyaluronové  $0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  až  $3 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

##### 4.6.2. Interakce tenzidu se systémem polyelektrolyt – fluorescenční sonda

Do plastových zkušev bylo napipetováno 15,3  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku fluorescenční sondy akridinové oranže. Výsledná koncentrace AO ve zkuševkách byla  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Do každé zkuševky, kromě blanku, bylo ze zásobního roztoku napipetováno 57,9  $\mu\text{l}$  kyseliny hyaluronové. Následně bylo do každé zkuševky přidáváno ze zásobního roztoku různé množství tenzidu CTAB tak, aby po doplnění zkuševky mili-Q vodou na výsledný objem 3 ml byla vytvořena koncentrační řada o 21 vzorcích v koncentračním rozsahu CTAB  $0 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  až  $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Vzorky pro další měření s tenzidem byly připraveny stejným způsobem jako v předchozím případě. Změna byla pouze v koncentrační řadě, která činila 40 vzorků v koncentračním rozsahu CTAB  $0 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  až  $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

## 4.7. Vlastní měření

### 4.7.1. Měření emisních spekter

Na luminiscenčním spektrometru bylo měřeno emisní spektrum akridinové oranže při emisní vlnové délce 530 nm a excitační vlnové délce 492 nm v rozsahu vlnových délek od 450 nm do 750 nm. Byl studován růst a pokles intenzity fluorescence v závislosti na poměru P/D, kde P je molární koncentrace vazebných míst pro sondu, v tomto případě koncentrace karboxylových skupin nacházejících se na řetězci hyaluronanu a D je koncentrace fluorescenční sondy (AO).

### 4.7.2. Měření absorpčních spekter

Na UV-VIS spektrofotometru bylo měřeno absorpční spektrum akridinové oranže v rozsahu vlnových délek od 200 nm do 700 nm. Byl studován růst a pokles poměru mezi absorpčním maximem dimeru a absorpčním maximem monomeru. Dále byla absorpční spektra použita pro korekce emisních spekter akridinové oranže.

## 4.8. Korekce emisních spekter

Vlivem vnitřního filtračního efektu prvního druhu je pozorovaná intenzita fluorescence menší než skutečná intenzita fluorescence. Protože vnitřní filtrační efekt může zkreslit měřené závislosti, je potřeba odstranit vnitřní filtrační efekt pomocí následujícího výpočtu:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \cdot 10^{\frac{1}{2}(OD_{\text{ex}} + OD_{\text{em}})}, \quad (4)$$

kde  $F_{\text{corr}}$  je korigovaná intenzita fluorescence,  $F_{\text{obs}}$  pozorovaná intenzita fluorescence,  $OD_{\text{ex}}$  je optická hustota při excitační vlnové délce a  $OD_{\text{em}}$  je optická hustota při emisní vlnové délce. Protože mezi optickou hustotou a absorbancí platí vztah

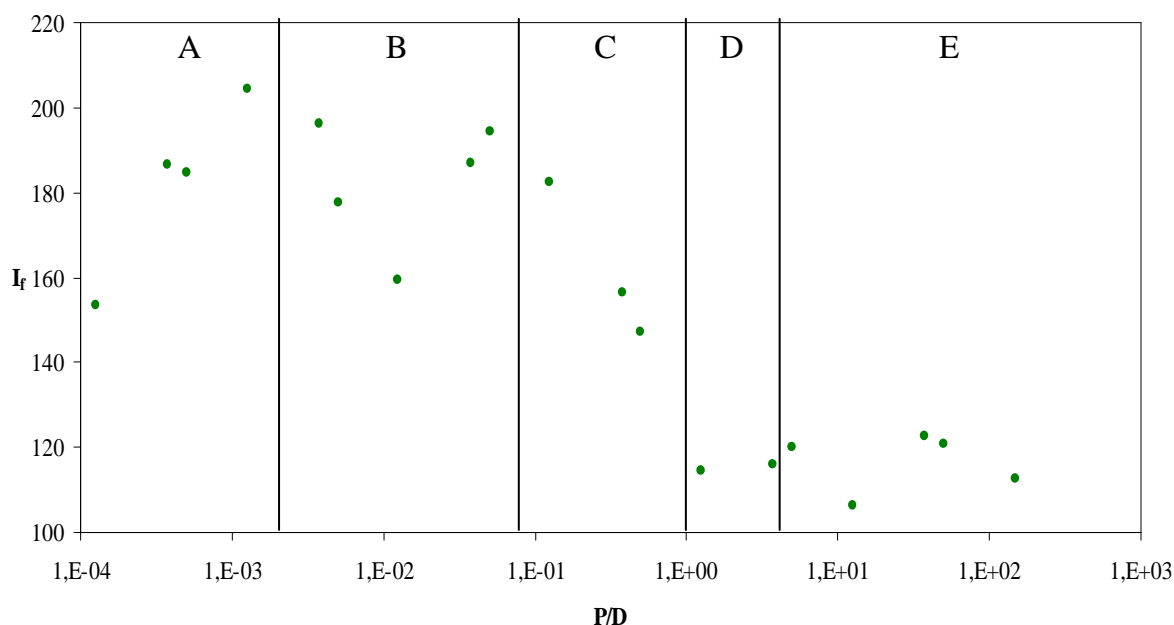
$$OD = \frac{A_{\lambda}}{l}, \quad (5)$$

může být optická hustota nahrazena absorbancí v případě, že je k měření používána kyveta o tloušťce 1 cm.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1. Interakce fluorescenční sondy s polyelektrolytem

Akridinová oranž se na kyselinu hyaluronovou váže prostřednictvím karboxylových skupin, které jsou rozmístěny po celém řetězci hyaluronanu. Obecně platí, že 400 molů kyseliny hyaluronové má 1 mol karboxylových skupin. Při studiu interakce fluorescenční sondy a hyaluronanu byl použit modelový předpoklad, že se na každou disociovanou karboxylovou skupinu váže právě jedna molekula AO a teprve po následném zvýšení koncentrace AO dochází ke tvorbě dimerů.



**Obr. 15** Závislost intenzity fluorescence sondy na podílu koncentrací vazebných míst kyseliny hyaluronové a koncentrace fluorescenční sondy AO. Při konstantní koncentraci AO ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) byl rostoucí poměr  $P/D$  zajištěn rostoucí koncentrací hyaluronanu ve vzorcích.

Oblast A: První přídavky hyaluronanu způsobily zvýšení intenzity fluorescence. Ke zvýšení pravděpodobně došlo kvůli interakci samotných monomerů AO v roztoku s hyaluronanem a molekuly AO se začaly vázat na karboxylové skupiny hyaluronanu.

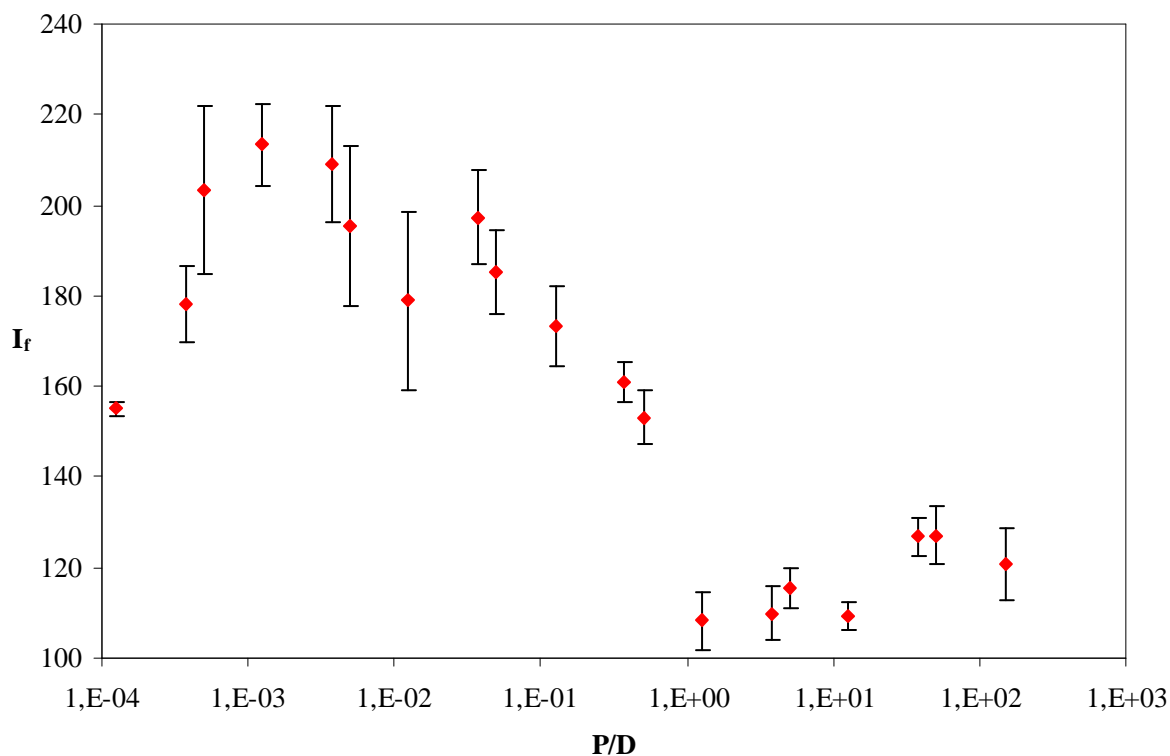
Oblast B: Došlo k poklesu intenzity fluorescence. Vzhledem k velikosti chybových úseček (Obr. 16) existují dvě možné interpretace příčiny dějů v oblasti B. Buď se karboxylové skupiny postupně sytily monomery akridinové oranže nebo k poklesu intenzity fluorescence došlo kvůli tvorbě dimerů AO, i když ještě nebyly obsazeny všechny karboxylové skupiny. Nárůst intenzity fluorescence v této oblasti by proto znamenal následné sycení karboxylových skupin monomery akridinové oranže až do nasycení všech karboxylových skupin, tedy do maximální hodnoty intenzity fluorescence.

Oblast C: Pokles intenzity fluorescence v důsledku tvorby dimerů AO. Následkem bylo zhášení fluorescence.

Oblast D: Intenzita fluorescence dosáhla v této oblasti svého lokálního minima, což znamená, že se v této oblasti nachází bod ekvivalence. Tento bod bude pravděpodobně mezi

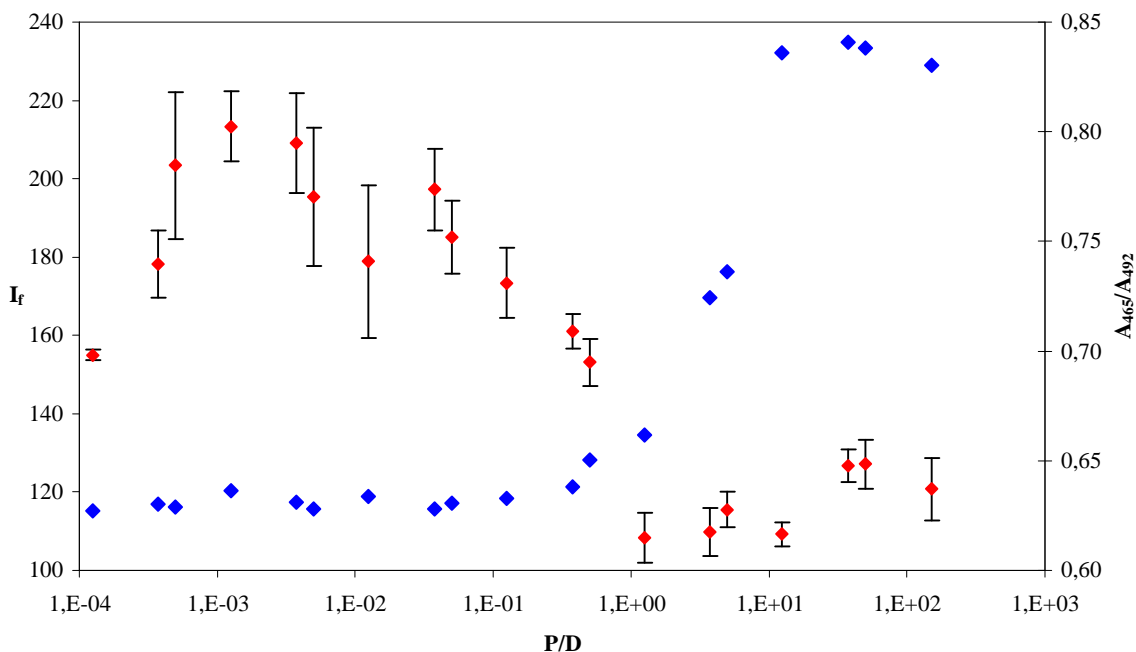
koncentracemi hyaluronanu  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $7,5 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Bodem ekvivalence je taková koncentrace hyaluronanu, kdy se všechny jeho karboxylové skupiny nasatí dimery AO. Po zjištění přibližné koncentrace tohoto bodu (oblast *D*) byly tomuto výsledku přizpůsobeny další měření tak, že byla zúžena koncentrační řada přibližně na oblast *D*.

Oblast *E*: Vzhledem k chybovým úsečkám v této oblasti nedochází k výraznějším změnám intenzity fluorescence. Na přesnější určení dějů v oblasti *E* by byla zapotřebí měření o více vzorcích a o specifitějším rozsahu koncentrační řady, ale i tak měření přibližně naznačila, co by se v této oblasti mohlo odehrávat. Pravděpodobně došlo dvakrát k rozpadu dimerů AO na monomery a následně k opětovné tvorbě dimeru.



**Obr. 16** Směrodatná odchylka interakce kationaktivní fluorescenční sondy se záporně nabitým polyelektrolytem. Při konstantní koncentraci AO ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) byl rostoucí poměr *P/D* zajištěn rostoucí koncentrací hyaluronanu ve vzorcích.

Opakováním měření interakce fluorescenční sondy se záporně nabitým polyelektrolytem byla získána směrodatná odchylka tohoto měření (Obr. 16). Při nižších poměrech *P/D* jsou odchylky větší než při vyšších poměrech *P/D*. Větší odchylky při nižších poměrech *P/D* jsou pravděpodobně způsobeny tím, že se do těchto vzorků pipetovalo menší množství hyaluronanu, než do vzorků při vyšších poměrech *P/D*.



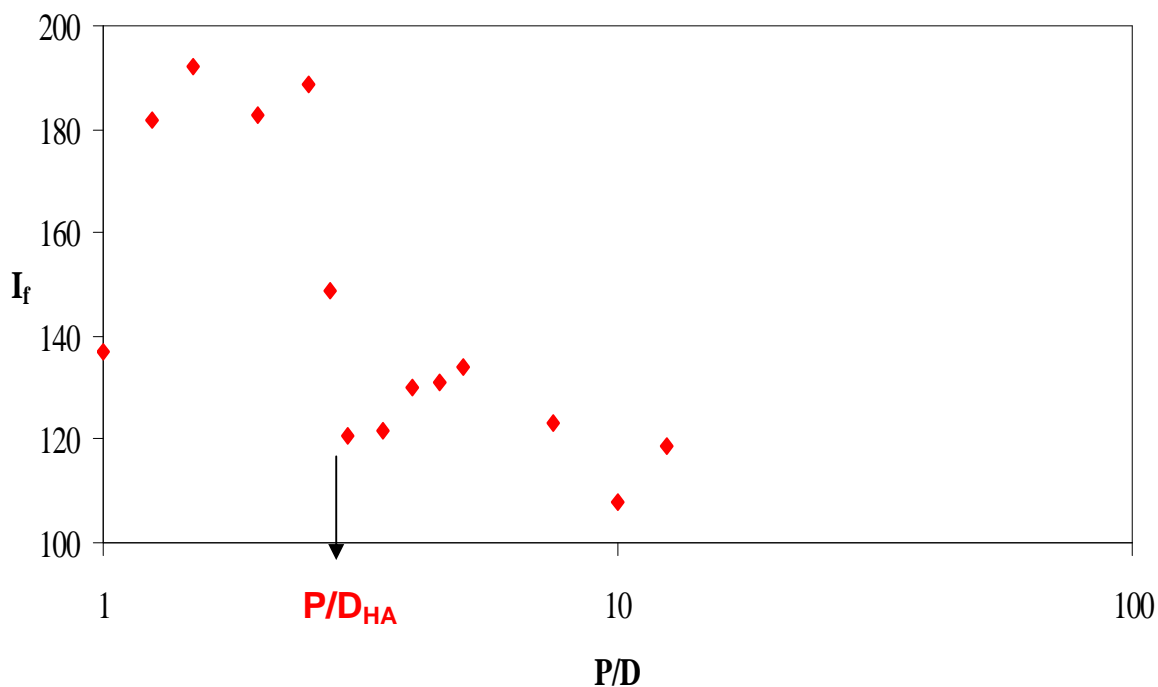
**Obr. 17** Interakce kationaktivní fluorescenční sondy se záporně nabitým polyelektrolytem. Na hlavní ose graf závislosti intenzity fluorescence na poměru  $P/D$  (červeně zobrazené body). Na vedlejší ose graf závislosti poměru absorbance dimeru (465 nm) a absorbance monomeru (492 nm) ku poměru  $P/D$  (modře zobrazené body). Při konstantní koncentraci AO ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) byl rostoucí poměr  $P/D$  zajištěn rostoucí koncentrací hyaluronanu.

Porovnáním grafu interakce kationaktivní fluorescenční sondy se záporně nabitým polyelektrolytem s poměrem absorbance dimeru ku absorbanci monomeru s poměrem  $P/D$  (Obr. 17), byla ověřena tvorba dimeru. Při nižších poměrech  $P/D$  není tvorba dimeru patrná, ale u koncentrace hyaluronanu  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , tedy přibližně u poměru  $P/D=1,3$ , prudce klesla intenzita fluorescence a zároveň prudce vzrostl poměr absorbance dimeru ku monomeru, což znamená intenzivní tvorbu dimeru přibližně od nasycení karboxylových skupin monomerem AO.

## 5.2. Interakce fluorescenční sondy s polyelektrolytem (zúžená koncentrační řada)

Po zjištění přibližného poměru  $P/D$ , při kterém by měla být většina disociovaných karboxylových skupin obsazena dimery AO, byla zúžena koncentrační řada na rozsah poměru  $P/D$  1 – 15 (Obr. 18). Byl získán koncový bod titrace, tedy koncentrace hyaluronanu při které jsou všechny dostupné disociované karboxylové skupiny nasyceny dimery akridinové oranže a ideálně žádné molekuly AO nejsou v monomerní formě obsaženy v roztoku. V grafu je tento bod označen jako  $P/D_{\text{HA}}$ . Bod  $P/D_{\text{HA}}$  má hodnotu  $P/D=3$  (koncentrace hyaluronanu  $6 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), což znamená, že na jednu molekulu akridinové oranže připadnou 3 disociované karboxylové skupiny hyaluronanu. V ideálním případě by se na jednu molekulu  $\text{COO}^-$  měly navázat 2 molekuly AO a tím by měla být každá karboxylová skupina nasycena právě jedním dimerem akridinové oranže. Z toho plyne, že ideální hodnota poměru  $P/D$  by měla být  $P/D=0,5$ . Tato skutečnost ukazuje, že výpočet poměru  $P/D$  je pouze orientační. Faktor ovlivňující naměřenou hodnotu  $P/D$  může být například stupeň disociace hyaluronanu nebo

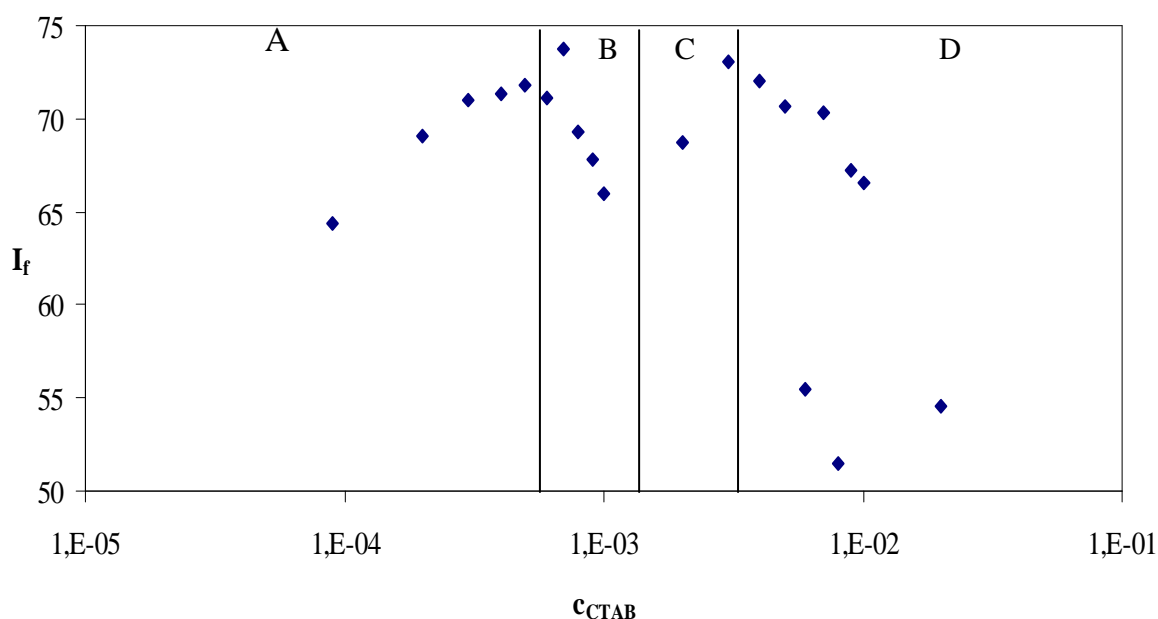
například skutečnost, že akridinová oranž může tvořit jak dimery, tak i oligomery. Poměr  $P/D_{HA}$  byl použit pro další měření s CTAB. Byl použit z toho důvodu, že v tomto bodě dosahuje hodnota intenzity fluorescence svého minima.



**Obr. 18** Závislost interakce kationaktivní fluorescenční sondy s negativně nabitým polyelektrolytem na poměru  $P/D$ . Při konstantní koncentraci AO ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) byl rostoucí poměr  $P/D$  zajištěn rostoucí koncentrací hyaluronanu ve vzorcích. Osa  $x$  je vynesena v logaritmickém měřítku

### 5.3. Interakce tenzidu se systémem polyelektrolyt – fluorescenční sonda

První měření s tenzidem již přibližně naznačily, jak se bude systém polyelektrolyt – AO chovat v přítomnosti tenzidu.



**Obr. 19** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci CTAB. Všechny vzorky obsahovaly konstantní množství AO ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), konstantní množství hyaluronanu ( $6 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a rostoucí množství CTAB

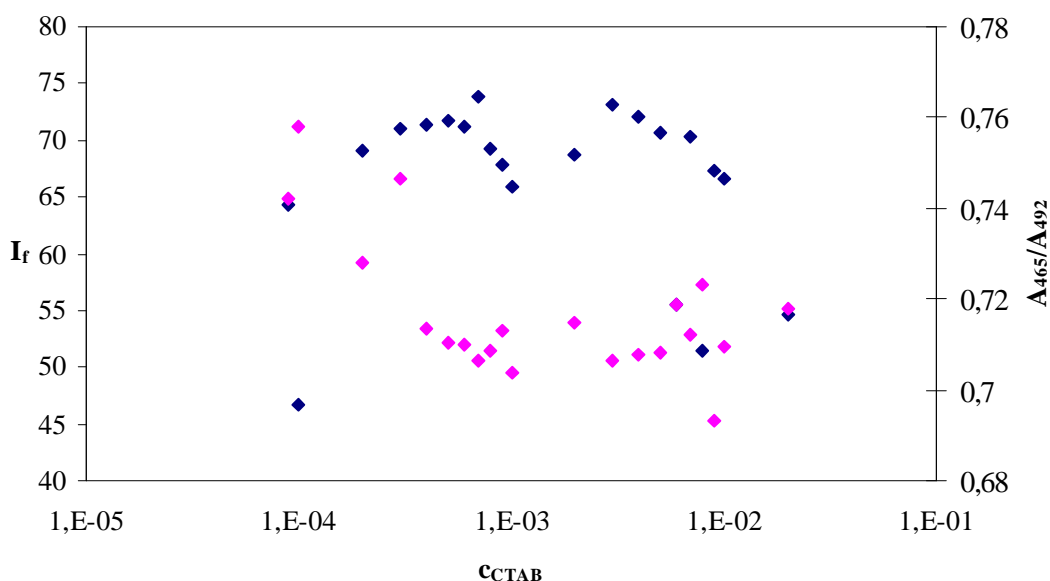
Z grafu (Obr. 19) plyne, že byl studován vzrůst a pokles intenzity fluorescence na koncentraci CTAB.

Oblast A: Již první přídavek CTAB do vzorku s konstantní koncentrací akridinové oranže a hyaluronanu způsobil nárůst intenzity fluorescence, což bylo způsobeno vytěsněním dimeru akridinové oranže z disociované karboxylové skupiny kationaktivním CTAB. Vytěsněním dimeru AO došlo k rozpadu dimeru AO na monomery a tím i ke zvýšení intenzity fluorescence. Z těchto výsledků nebylo možno přesně určit, jestli se v použitých koncentracích CTAB váží samotné monomery tenzidu na karboxylové skupiny hyaluronanu nebo jestli se na  $\text{COO}^-$  skupiny váží tenzidy v micelární formě. Z tohoto důvodu byla v dalších měřeních rozšířena koncentrační řada o vzorky s nižší koncentrací CTAB.

Oblast B: Koncentrace ve vzorcích v oblasti B se stále více blíží kritické micelární koncentraci. Existují dvě možnosti interpretace příčiny snížení intenzity fluorescence. Za prvé došlo k poklesu intenzity fluorescence proto, že tenzidy začaly agregovat na karboxylových skupinách hyaluronanu v micely, agregací tenzidu se uvolnily jiné karboxylové skupiny a došlo k opětovnému navázání akridinové oranže a k tvorbě dimeru. Díky opětovné tvorbě dimeru došlo ke snížení intenzity fluorescence. Druhou možností poklesu intenzity fluorescence byla změna konformace hyaluronanu vlivem navázání micel CTAB.

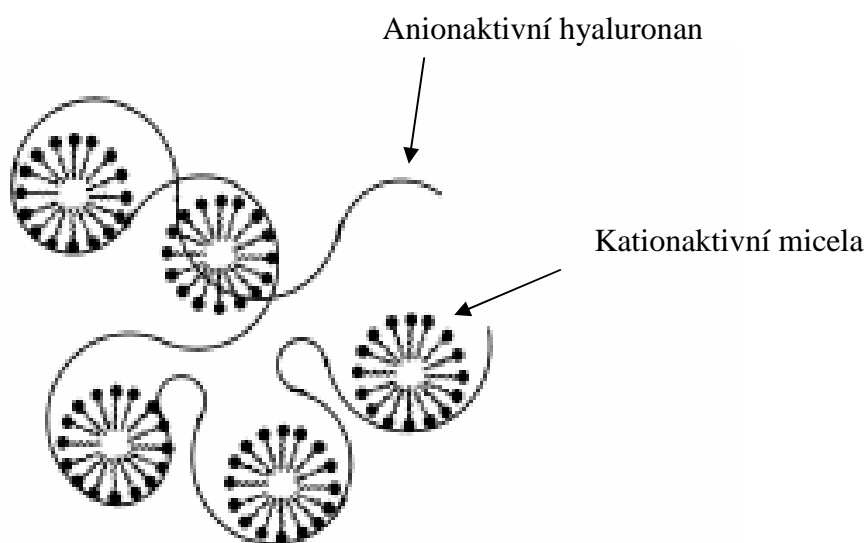
Pravděpodobnější z obou možností je ale snížení intenzity fluorescence z důvodu opětovné tvorby dimeru. Na grafu (Obr. 20) je znatelné snížení množství dimeru paralelně s prvními přídávky tenzidu, tedy se zvýšením intenzity fluorescence. Následné snížení intenzity

fluorescence doprovází mírný nárůst množství dimeru akridinové oranže, což by mohlo znamenat agregaci tenzidu a uvolnění karboxylových skupin. Pravděpodobná tvorba micel na vazných místech anionaktivního hyaluronanu je znázorněna na obrázku 21 (Obr. 21).



**Obr. 20** Interakce tenzidu se systémem polyelektrolyt – fluorescenční sonda. Na hlavní ose graf závislosti intenzity fluorescence na koncentraci CTAB (modře zobrazené body). Na vedlejší ose graf závislosti poměru absorbance dimeru (465 nm) a absorbance monomeru (492 nm) na koncentraci CTAB (růžově zobrazené body). Všechny vzorky obsahovaly konstantní množství AO ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), konstantní množství hyaluronanu ( $6 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a rostoucí množství CTAB

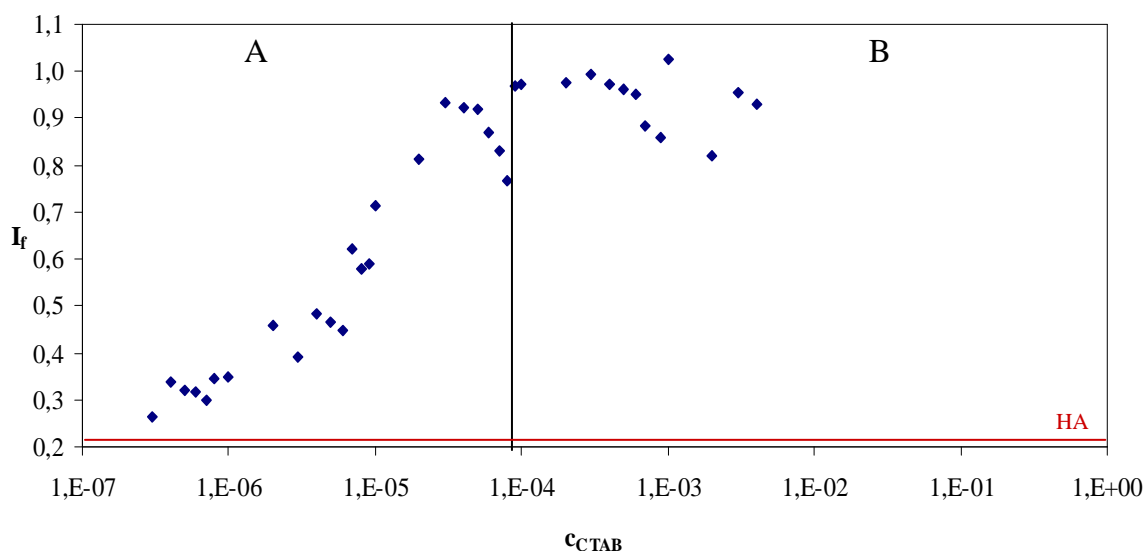
Oblast C,D: Oblast C a D nemohla být z těchto měření dostatečně interpretována, protože k bližšímu poznání dějů v oblasti C a D jsou zapotřebí další měření i s jinými fluorescenčními sondami než pouze s akridinovou oranží. Tato skutečnost platí i pro přesné určení dějů v oblastech A a B.



**Obr. 21** Znáznornění komplexu negativně nabitého hyaluronanu s kationaktivními micelami



Při dalších měřeních s tenzidem byla práce zaměřena na koncentrace především daleko před kritickou micelární koncentrací CTAB, a to z toho důvodu, aby bylo zjištěno, jestli se na řetězec hyaluronanu váží nejprve samotné molekuly tenzidu nebo přímo tenzidy v micelární formě. Při měřeních (Obr. 22) byl studován růst a pokles intenzity fluorescence na koncentraci CTAB.



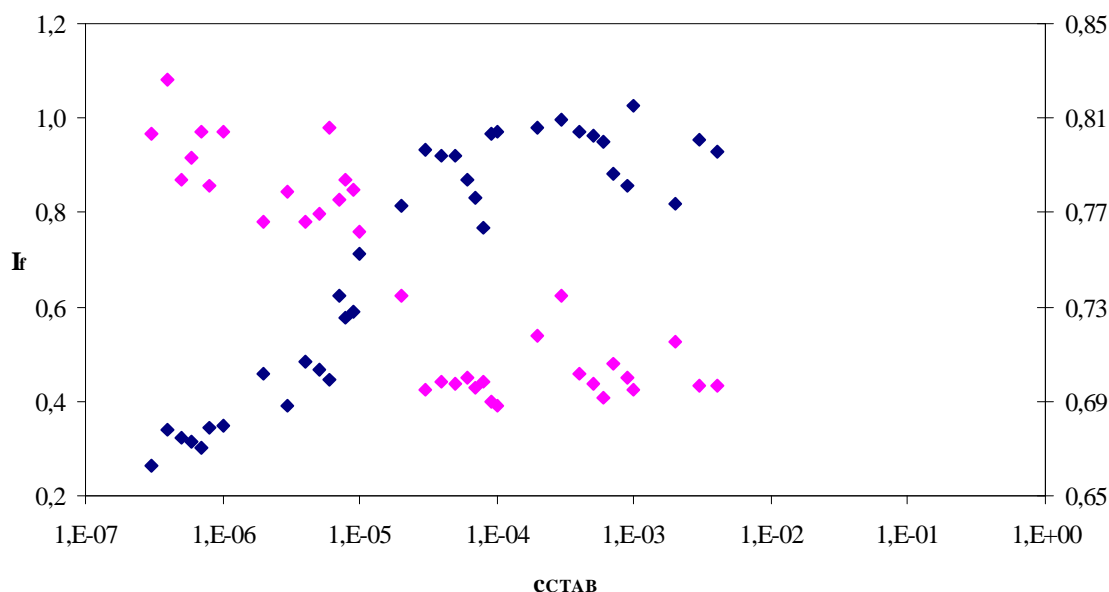
**Obr. 22** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci CTAB. Všechny vzorky obsahovaly konstantní množství AO ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), konstantní množství hyaluronanu ( $6 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a rostoucí množství CTAB

Oblast A: Bod HA, který se nachází u hodnoty 0,223, je vzorek sondy s hyaluronanem (bez přidání tenzidu). Jak plyne z grafu, tak s prvním přidáním i minimálního množství tenzidu se zvyšuje intenzita fluorescence, což pravděpodobně znamená vytěsnění dimeru AO molekulami tenzidu. Následně dochází u koncentrace  $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  k poklesu intenzity fluorescence. Jelikož se tato koncentrace nachází blízko kritické agregační koncentrace CTAB, tak by snížení intenzity fluorescence mohlo být připsáno tvorbě tenzidu v micelární formě, ale ne tvorbě pravých micel. To by znamenalo, že zvýšení intenzity fluorescence v oblasti B je způsobeno poutáním tenzidů v micelární formě na řetězec hyaluronanu, což má za následek uvolnění některých karboxylových skupin a zpětnou tvorbu dimeru AO.

Oblast B: Tato část grafu má shodný průběh jako oblast A a B závislosti intenzity fluorescence na koncentraci CTAB na obrázku 19 (Obr. 19).

Srovnáním naměřené závislosti intenzity fluorescence na koncentraci CTAB s poměry absorbancí při 465 nm a 492 nm (Obr. 23) bylo zjištěno, že zvýšení intenzity fluorescence, paralelně následované snižováním koncentrace dimeru, bylo způsobeno rozpadem dimeru akridinové oranže na monomery. Z toho plyne, že jediná možnost, jak mohl být dimer AO uvolněn z karboxylové skupiny hyaluronanu, je vytlačení dimeru molekulami tenzidu. Jelikož docházelo k nárůstu intenzity fluorescence v mnohem menších koncentracích, než je kritická micelární koncentrace CTAB nebo kritická agregační koncentrace CTAB, docházelo nejdříve

k navázání samotných molekul tenzidu. Jak se váží následné agregáty tenzidu na hyaluronan není z těchto výsledků průkazné. I když dochází ke snížení intenzity fluorescence okolo kritické micelární koncentrace CTAB, což by mělo za následek agregaci tenzidu a uvolnění vazných míst pro dimer AO, tak poměr absorbancí tyto závěry nepotvrzuje.



**Obr. 23** Interakce tenzidu se systémem polyelektrolyt – fluorescenční sonda. Na hlavní ose graf závislosti intenzity fluorescence na koncentraci CTAB (modře zobrazené body). Na vedlejší ose graf závislosti poměru absorbance dimeru (465 nm) a absorbance monomeru (492 nm) na koncentraci CTAB (růžově zobrazené body). Všechny vzorky obsahovaly konstantní množství AO ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), konstantní množství hyaluronanu ( $6 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a rostoucí množství CTAB

## 6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo prozkoumat interakce kationaktivní fluorescenční sondy akridinové oranže s polysacharidem kyselinou hyaluronovou a následně prozkoumat interakce kationaktivního tenzidu se systémem kyselina hyaluronová – akridinová oranž.

První práce praktické části byly zaměřeny na zkoumání interakcí mezi kationaktivní fluorescenční sondou akridinovou oranží a polyelektrolytem hyaluronanem. Předpokladem bylo, že se bude kationaktivní sonda vázat na disociované karboxylové skupiny hyaluronanu. Ve vzorcích bylo obsaženo konstantní množství fluorescenční sondy a rostoucí množství hyaluronanu. Při měření emisních spekter akridinové oranže docházelo k růstu a poklesu intenzity fluorescence. Vlivem vazby monomeru akridinové oranže na disociované karboxylové skupiny hyaluronanu docházelo k nárůstu intenzity fluorescence, zatímco vlivem vazby dimerů akridinové oranže docházelo k poklesu intenzity fluorescence. Hledána byla koncentrace hyaluronanu, při které bude intenzita fluorescence nejnižší, tedy kdy budou všechny dostupné disociované karboxylové skupiny obsazeny dimery AO. Nejnižší hodnoty intenzity fluorescence byly naměřeny mezi koncentracemi hyaluronanu  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  až  $7,5 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Absorpčními spektry akridinové oranže bylo ověřeno, že pokles intenzity fluorescence byl způsoben dimery AO. Dimer akridinové oranže má totiž absorpční maximum při 465 nm a monomer akridinové oranže při 492 nm. Vynesením závislosti poměru těchto dvou hodnot na poměru P/D bylo zjištěno, že se dimer začal tvořit přibližně od poměru P/D, kterému odpovídá i počátek poklesu intenzity fluorescence. Kvůli zjištění přesnější hodnoty bodu ekvivalence byla zúžena koncentrační řada hyaluronanu na rozmezí poměru P/D 1–15. Bylo získáno minimum intenzity fluorescence při hodnotě poměru P/D = 3, takže při koncentraci hyaluronanu  $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Koncentrace hyaluronanu  $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  byla použita pro měření s tenzidem. Ve vzorcích bylo obsaženo konstantní množství akridinové oranže, konstantní množství hyaluronanu a rostoucí množství tenzidu CTAB. Náštělová měření ukázala, že po prvním přidání tenzidu docházelo ke zvýšení intenzity fluorescence, což mohlo být způsobeno pouze vytlačením dimeru AO tenzidem a následným rozpadem dimeru AO na monomery. Nebylo možno přesně určit, jestli se na hyaluronan vázaly samotné monomery nebo tenzidy v micelární formě. Blízko kritické micelární koncentrace došlo k poklesu intenzity fluorescence. K poklesu intenzity fluorescence došlo buď tvorbou micel a uvolněním karboxylových skupin hyaluronanu, což by mělo za následek opětovné navázání dimeru AO, nebo došlo vlivem navázání micel na hyaluronan ke změně konformace hyaluronanu. Pro přesné určení dějů za kritickou micelární koncentrací jsou nutná další měření i s jinými fluorescenčními sondami, popřípadě použití jiných metod.

Další měření byla soustředěna od koncentrací hluboko před kritickou micelární koncentrací až po kritickou micelární koncentraci CTAB. Bylo zjištěno, že při prvním přidání tenzidu, jehož koncentrace byla hluboko před kritickou micelární koncentrací i před kritickou agregační koncentrací, docházelo ke zvýšení intenzity fluorescence. Zvýšení intenzity fluorescence znamenalo, že monomery tenzidu vytlačovaly dimery AO. Okolo kritické agregační koncentrace CTAB došlo k poklesu intenzity fluorescence, což by znamenalo vazání tenzidu v micelární formě, ale ne tvorbu micel. Srovnání s absorpčními spektry ale tyto výsledky nepotvrdilo. Potvrdilo pouze vazbu monomeru na karboxylové skupiny hyaluronanu.

## 7 LITERATURA

- [1] *Uv-Visible Spectroscopy* [online]. c2005 - 2006 [cit. 2010-02-28]. Dostupné z WWW: <http://www.bookrags.com/research/uv-visible-spectroscopy-wop/>
- [2] *Beer-Lambert law* In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, , 25.2.2010 [cit. 2010-03-06]. Dostupné z WWW: [http://en.wikipedia.org/wiki/Beer-Lambert\\_law](http://en.wikipedia.org/wiki/Beer-Lambert_law)
- [3] SOMMER, Lumír. *Analytická spektrometrie I*. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 173 s
- [4] ČERNOHORSKÝ, Tomáš; JANDERA, Pavel. *Atomová spektroskopie*. Pardubice : Univerzita Pardubice, 1997. 218 s. ISBN 80-7194-114-X
- [5] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava : Pavel Klouda, 1996. 203 s. ISBN 80-902155-0-5
- [6] [www.olympusmicro.com](http://www.olympusmicro.com) [online]. c2000-2009 [cit. 2010-03-01]. *Fluorescence microscopy: Basic concepts in fluorescence*. Dostupné z WWW: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>
- [7] STUŽKA, Václav. *Analytická atomová optická spektrometrie*. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2000. 81 s. ISBN 80-244-0206-8
- [8] BRDIČKA, Rudolf; DVOŘÁK, Jiří. *Základy fyzikální chemie*. Praha : Nakladatelství Československé akademie věd, 1977. 852 s
- [9] VALEUR, Bernard. *Molecular fluorescence : Principles and applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. 381 s. ISBN 3-527-29919-X
- [10] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy* [online]. Baltimore : School of medicine (University of Maryland), 2006 [cit. 2010-03-08]. ISBN 0-387-31278-1. Dostupné z WWW: <http://books.google.cz/books?id=-PSybuLNxcAC&pg=PA277&dq=fluorescence+quenching&cd=1#v=onepage&q=fluorescence%20quenching&f=false>
- [11] *Fluorofory v biomedicíně* [online]. [cit. 2010-03-08]. Dostupné z WWW: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [12] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemicko-inženýrská, 2001. 198 s. ISBN 80-7080-422-X
- [13] BARTOVSKÁ, Lidmila; ŠÍŠKOVÁ, Marie. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemicko-inženýrská, 2002. 192 s. ISBN 80-7080-475-0
- [14] COSTANTINO, Lucia; GUARINO, Gennaro; ORTONA, Ornella; VITAGLIANO, Vincenzo. Acridine Orange Association Equilibrium in Aqueous Solution. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 1984, 29, s. 62-66
- [15] [web.natur.cuni.cz](http://web.natur.cuni.cz) [online]. [cit. 2010-03-13]. *Fluorescenční mikroskopie*. Dostupné z WWW: <http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescencni.htm>
- [16] WANG, Fei, et al. Study on the formation and depolymerization of acridine orange dimer in acridine orange–sodium dodecyl benzene sulfonate–protein system. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2006, 298, s. 757-764. Dostupný také z WWW: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

- [17] TAN, J. S.; SCHNEIDER, R. L. Dye Binding and Its Relation to polyelectrolyte Conformation. *The Journal of Physical Chemistry*. 1975, Vol. 79, No. 14, s. 1380-1386
- [18] KAKEHI, Kazuaki; KINOSHITA, Mitsuhiro; YASUEDA, Shin-ichi. Hyaluronic aci: separation and biological implications. *Journal of CHromatography B*. 2003, 797, s. 347-355
- [19] PRICE, Richard D.; BERRY, MG; NAVSARIA, Harshad A. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2007, 60, s. 1110-1119
- [20] OH, Eun Ju, et al. Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *Journal of Controlled Release*. 2009, 141, s. 2-12
- [21] HASCALL, Vincent C.; LAURENT, Torvard C. Glycoforum.gr.jp [online]. 15.12.2007 [cit. 2010-03-13]. *Hyaluronan: Structure and Physical Properties*. Dostupné z WWW: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html#VIII>
- [22] Hyaluronan In Wikipedia : the free encyclopedia [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, , 14.02.2010 [cit. 2010-03-14]. Dostupné z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Hyaluronan>
- [23] LAURETTI, Flávio, et al. Use of acridine orange staining for the detection of rotavirus RNA in polyacrylamide gels. *Journal of Virological Methods*. December 2003, 114, 1, s. 29-35
- [24] XIAO, Xilin, et al. Resonance light scattering metho for the determination of anionic surfactant with acridine orange. *Spectrochimica Acta Part A*. 2008, 71, s. 398-402
- [25] MAL, Jean; KATHURIA, Satish; MEYTS, Peirre de. Acridine orange, an inhibitor of protein kinase C, abolishes insulin and growth hormone stimulation of lipogenesis in rat adipocytes. *FEBS Letters*. 27 February 1989, 244, s. 465-468
- [26] KAPUSCINSKI, Jan; DARZYNKIEWICZ, Zbigniew; MELAMED, Myron R. Interactions of acridine orange with nucleic acids: Properties of complexes of acridine orange with single stranded ribonucleic acid. *Biochemical Pharmacology*. 15 December 1983, 32, 24, s. 3679-3694
- [27] MCFETERS, G. A., et al. Acridine orange staining reaction as an index of physiological activity in Escherichia coli. *Journal of Microbiological Methods*. June 1991, 13, 2, s. 87-97
- [28] SARKAR, Deepali; MISRA, T. N. Electrical conduction in some nucleic acid base complexes with acridine orange dye: study of localized levels. *Biomaterials*. April 1989, 10, 3, s. 202-205
- [29] MASON, David J.; LLOYD, David. Acridine orange as an indicator of bacterial susceptibility to gentamicin. *FEMS Microbiology Letters*. 1 August 1997, 153, s. 199-204
- [30] BORUAH, Bornali, et al. Partition equilibrium of phenol red in aqueous polymer-surfactant system:Determination of critical aggregation concentration. *Journal of Molecular Liquids*. 20 November 2009, 151, s. 81-85
- [31] BAKSHI, Mandeep S.; KAUR, I. Surfactant–polymer aggregates of mixed cationic micelles and anionic polyelectrolytes: a surfactant head group contribution. *Progress in Colloid and Polymer Science*. 2003, 122, s. 37-46. Dostupný také z WWW: <http://www.springerlink.com/content/57ru46497635x007/>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AO	akridinová oranž
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
$I_0$	dopadající zářivý tok
$I$	prošlý zářivý tok
$T$	transmitance
$A$	absorbance
$\epsilon$	molární absorbční koeficient
$c$	koncentrace
$l$	tloušťka vrstvy
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
$\lambda$	vlnová délka
PAL	povrchově aktivní látka
CMC	kritická micelární koncentrace
P	vazebná místa polymeru
D	koncentrace fluorescenční sondy
$I_F$	intenzita fluorescence
$A_{465}$	absorbance při vlnové délce 465 nm
$A_{492}$	absorbance při vlnové délce 492 nm

## 8 PŘÍLOHY

Příloha 1 *Luminiscenční spektrometr, AMINCO-Browman, Series 2*



Příloha 2 *UV-VISIBLE Spektrofotometr, Cary 50 Probe*

